

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 07 mai 2001 (07.05.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/02052	Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 99040 G1
Date du dépôt international (jour/mois/année) 13 juillet 2000 (13.07.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 16 juillet 1999 (16.07.99)
Déposant BECLIN, Christophe etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

09 février 2001 (09.02.01)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Antonia Muller
no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	no de téléphone: (41-22) 338.83.38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No

PCT/FR 00/02052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/29 C12N15/82 C07K14/415 C12Q1/68 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A01H C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBL, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AB025633, 9 April 1999 (1999-04-09) NAKAMURA, Y.: "Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MQM1." XP002157926 voir nts 21977-25251, /db_xref="SPTREMBL:Q9LDX1",/note="gene_id: MQM1.17", ---	1-11, 19-21
X	DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: A0010650, 29 May 1998 (1998-05-29) ROUNSLEY S.D., ET AL.: "F27C8TRC IGF Arabidopsis thaliana genomic clone F27C8, genomic survey sequence." XP002157927 the whole document ---	2,8-10, 19-21

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 January 2001

Date of mailing of the international search report

05/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No

PCT/FR 00/02052

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AL084227, 28 June 1999 (1999-06-28) SALANOUBAT M., ET AL.: "Arabidopsis thaliana genome survey sequence T7 end of BAC F8G21 of IGF library from strain Columbia of Arabidopsis thaliana" XP002157928 the whole document</p>	2,8-10, 19-21
X	<p>ELMAYAN TALINE ET AL: "Arabidopsis mutants impaired in cosuppression" PLANT CELL, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 10, no. 10, October 1998 (1998-10), pages 1747-1757, XP002149063 ISSN: 1040-4651 the whole document</p>	22
P,X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AF239719, 7 June 2000 (2000-06-07) MOURRAIN, P., ET AL.: "Arabidopsis thaliana SGS3 gene, complete cds." XP002157929 the whole document -& MOURRAIN, P., ET AL.: "Arabidopsis SGS2 and SGS3 Genes are Required for Posttranscriptional Gene Silencing and Natural Virus Resistance" CELL, vol. 101, 26 May 2000 (2000-05-26), pages 533-542, XP002149066 the whole document</p>	2,3, 7-10, 19-21
P,X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AV566465, 16 June 2000 (2000-06-16) NAKAMURA, Y., ET AL.: "Arabidopsis thaliana cDNA clone:SQ244b06F, 3' end." XP002157993 the whole document</p>	2,8-10, 19-21
P,X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AV525508, 15 June 2000 (2000-06-15) NAKAMURA, Y., ET AL.: " Arabidopsis thaliana cDNA clone:APD25d02R, 5' end." XP002157994 the whole document</p>	2,8-10, 19-21

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02052

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AI999551, 9 September 1999 (1999-09-09) CHEN J., ET AL.: "701556368 A. thaliana, Columbia Col-0, rosette-3 Arabidopsis thaliana cDNA clone 701556368, mRNA sequence." XP002157930 the whole document</p>	2,8-10, 19-21
P,X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AC009109, 4 August 1999 (1999-08-04) "Homo sapiens chromosome 16 clone RP11-467L24, WORKING DRAFT SEQUENCE, 14 ordered pieces." XP002157995 nts 71365-71735</p>	5
P,X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AQ964581, 31 January 2000 (2000-01-31) BUELL C.R., ET AL.: "LERGX20TR LERG Arabidopsis thaliana genomic clone LERGX20, genomic survey sequence." XP002157996 the whole document</p>	5
A	<p>VAUCHERET HERVE ET AL: "Transgene-induced gene silencing in plants" PLANT JOURNAL, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 16, no. 6, December 1998 (1998-12), pages 651-659, XP002149065 ISSN: 0960-7412 page 655 -page 656</p>	22
A	<p>WO 97 46690 A (ZENECA LTD ;DRAKE CAROLINE RACHEL (GB); BIRD COLIN ROGER (GB); SCH) 11 December 1997 (1997-12-11) the whole document</p>	15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02052

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9746690 A	11-12-1997	AU 726697 B	16-11-2000
		AU 2967497 A	05-01-1998
		CA 2252366 A	11-12-1997
		EP 0906435 A	07-04-1999
<hr/>			

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 99040 G1	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 02052	Date du dépôt international (jour/mois/année) 13/07/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année)) 16/07/1999
Déposant AVENTIS CROPS SCIENCE S.A.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).

3. ☐ **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/02052

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/29 C12N15/82 C07K14/415 C12Q1/68 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou a la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultee (systeme de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C07K A01H C12Q

Documentation consultee autre que la documentation minimale dans la mesure ou ces documents relevent des domaines sur lesquels a porte la recherche

Base de donnees electronique consultee au cours de la recherche internationale (nom de la base de donnees, et si realisable, termes de recherche utilises)

EPO-Internal, EMBL, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie *	Identification des documents cites, avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AB025633, 9 avril 1999 (1999-04-09) NAKAMURA, Y.: "Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MQM1." XP002157926 voir nts 21977-25251, /db_xref="SPTREMBL:Q9LDX1",/note="gene_id: MQM1.17",</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1-11, 19-21</p>
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: A0010650, 29 mai 1998 (1998-05-29) ROUNSELEY S.D., ET AL.: "F27C8TRC IGF Arabidopsis thaliana genomic clone F27C8, genomic survey sequence." XP002157927 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>2,8-10, 19-21</p>

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiques en annexe

* Categories speciales de documents cites:

- *A* document definissant l'etat general de la technique, non considere comme particulierement pertinent
- *E* document anterieur, mais publie a la date de depot international ou apres cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorite ou cite pour determiner la date de publication d'une autre citation ou pour une raison speciale (telle qu'indiquee)
- *O* document se referant a une divulgation orale, a un usage, a une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publie avant la date de depot international, mais posterieurement a la date de priorite revendiquee

- *I* document ulterieur publie apres la date de depot international ou la date de priorite et n'appartenant pas a l'etat de la technique pertinent, mais cite pour comprendre le principe ou la theorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulierement pertinent: l'invention revendiquee ne peut etre consideree comme nouvelle ou comme impliquant une activite inventive par rapport au document considere isolement
- *Y* document particulierement pertinent: l'invention revendiquee ne peut etre consideree comme impliquant une activite inventive lorsque le document est associe a un ou plusieurs autres documents de meme nature, cette combinaison etant evidente pour une personne du metier
- *&* document qui fait partie de la meme famille de brevets

Date a laquelle la recherche internationale a ete effectivement achevee

22 janvier 2001

Date d'expedition du present rapport de recherche internationale

05/02/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargee de la recherche internationale

Office European des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo.nl
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorise

Maddox, A

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AL084227, 28 juin 1999 (1999-06-28) SALANOUBAT M., ET AL.: "Arabidopsis thaliana genome survey sequence T7 end of BAC F8G21 of IGF library from strain Columbia of Arabidopsis thaliana" XP002157928 le document en entier</p> <p>---</p>	2,8-10, 19-21
X	<p>ELMAYAN TALINE ET AL.: "Arabidopsis mutants impaired in cosuppression" PLANT CELL, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 10, no. 10, octobre 1998 (1998-10), pages 1747-1757, XP002149063 ISSN: 1040-4651 le document en entier</p> <p>---</p>	22
P,X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AF239719, 7 juin 2000 (2000-06-07) MOURRAIN, P., ET AL.: "Arabidopsis thaliana SGS3 gene, complete cds." XP002157929 le document en entier -& MOURRAIN, P., ET AL.: "Arabidopsis SGS2 and SGS3 Genes are Required for Posttranscriptional Gene Silencing and Natural Virus Resistance" CELL, vol. 101, 26 mai 2000 (2000-05-26), pages 533-542, XP002149066 le document en entier</p> <p>---</p>	2,3, 7-10, 19-21
P,X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AV566465, 16 juin 2000 (2000-06-16) NAKAMURA, Y., ET AL.: "Arabidopsis thaliana cDNA clone:SQ244b06F, 3' end." XP002157993 le document en entier</p> <p>---</p>	2,8-10, 19-21
P,X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AV525508, 15 juin 2000 (2000-06-15) NAKAMURA, Y., ET AL.: "Arabidopsis thaliana cDNA clone:APD25d02R, 5' end." XP002157994 le document en entier</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	2,8-10, 19-21

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AI999551, 9 septembre 1999 (1999-09-09) CHEN J., ET AL.: "701556368 A. thaliana, Columbia Col-0, rosette-3 Arabidopsis thaliana cDNA clone 701556368, mRNA sequence." XP002157930 le document en entier ---</p>	2,8-10, 19-21
P,X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AC009109, 4 août 1999 (1999-08-04) "Homo sapiens chromosome 16 clone RP11-467L24, WORKING DRAFT SEQUENCE, 14 ordered pieces." XP002157995 nts 71365-71735 ---</p>	5
P,X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: A0964581, 31 janvier 2000 (2000-01-31) BUELL C.R., ET AL.: "LERGX20TR LERG Arabidopsis thaliana genomic clone LERGX20, genomic survey sequence." XP002157996 le document en entier ---</p>	5
A	<p>VAUCHERET HERVE ET AL: "Transgene-induced gene silencing in plants" PLANT JOURNAL, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 16, no. 6, décembre 1998 (1998-12), pages 651-659, XP002149065 ISSN: 0960-7412 page 655 -page 656 ---</p>	22
A	<p>WO 97 46690 A (ZENECA LTD ;DRAKE CAROLINE RACHEL (GB); BIRD COLIN ROGER (GB): SCH) 11 décembre 1997 (1997-12-11) le document en entier -----</p>	15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02052

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9746690 A	11-12-1997	AU 726697 B	16-11-2000
		AU 2967497 A	05-01-1998
		CA 2252366 A	11-12-1997
		EP 0906435 A	07-04-1999
<hr/>			

TRAITÉ DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS

REÇU D.P.I.

17 SEP 2001

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Destinataire:

AVENTIS CROPS SCIENCE S.A.
DEPARTEMENT PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
14-20 rue Pierre Baizet
BP 9163
69263 Lyon Cedex 09
FRANCE

PCT

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE
INTERNATIONAL
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année) 13.09.2001

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
PH 99040 G1

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR00/02052

Date du dépôt international (jour/mois/année)
13/07/2000

Date de priorité (jour/mois/année)
16/07/1999

Déposant
AVENTIS CROPS SCIENCE S.A. et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Hingel, W

Tél. +49 89 2399-8717

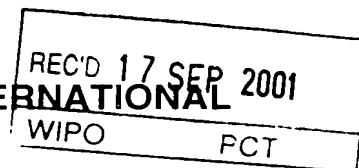


TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)




Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 99040 G1	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02052	Date du dépôt international (jour/mois/année) 13/07/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 16/07/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/00		
Déposant AVENTIS CROPS SCIENCE S.A. et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:
 - I ☒ Base du rapport
 - II ☒ Priorité
 - III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
 - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
 - V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
 - VI ☐ Certains documents cités
 - VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
 - VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 09/02/2001	Date d'achèvement du présent rapport 13.09.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Loubradou-Bourges, N N° de téléphone +49 89 2399 7342



RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/02052

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-24 version initiale

Revendications, N°:

1-22 version initiale

Dessins, feuilles:

1/1 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-6, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02052

- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffirable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

II. Priorité

1. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que les documents suivants n'ont pas été remis dans le délai prescrit :
- ☐ copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
- ☐ traduction de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
2. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que la revendication de la priorité a été jugée non valable.

Pour les besoins du présent rapport, la date de dépôt international indiquée plus haut est donc considérée comme la date pertinente.

3. Observations complémentaires, le cas échéant :
voir feuille séparée

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 12-22
	Non : Revendications 1-11
Activité inventive	Oui : Revendications 16-18
	Non : Revendications 12-15, 19-22
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-22
	Non : Revendications

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02052

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR00/02052

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPAREE

Les pièces suivantes de la demande servent de fondement à l'examen:

Dans la version pour les Etats contractants:

AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IT IE LI LU MC NL PT SE

Description, pages:

1-24 version initiale

Revendications, N°:

1-22 version initiale

Dessins, feuilles:

1/1 version initiale

Il est fait référence au document suivant :

D1: DATABASE EMBL [en ligne] ACCESSION NO: AB025633, 9 avril 1999 (1999-04-09) NAKAMURA, Y.: 'Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MQM1.' XP002157926

SECTION II

Une copie officielle des deux documents de priorité FR9909417 et FR0001006 relatifs à la présente demande a été fournie par le déposant en réponse à une première opinion écrite, permettant d'établir la validité des priorités revendiquées.

SECTION V

La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans le PCT pour les raisons suivantes:

1. Le document D2 décrit une séquence nucléotidique comprenant une séquence 100% identique sur 3275 nt avec la SEQ ID N°1. La protéine putative déduite possède une séquence 100% identique à la SEQ ID N°3. L'objet des revendications **1-11** est donc clairement anticipé par D2 et les dites revendications ne sont ni nouvelles ni inventives (Art- 33(2) et (3) PCT).
2. L'objet des revendications **12-13**, et des revendications **14-15** se référant à ces revendications, représente simplement des produits dérivés directs, qui constituent des variations évidentes pour l'homme du métier et n'impliquent pas d'activité inventive (Art. 33(3) PCT).
Les revendications **14** et **15**, relatant d'un vecteur comprenant un polynucléotide connu ou d'un procédé de transformation par intégration d'un polynucléotide connu dans la mesure où elles se réfèrent aux revendications 1-9 et 10, n'est pas considérée comme inventive (Art. 33(3) PCT).
L'objet des revendications **19-22**, qui relatent simplement d'organismes hôtes transformés avec une séquence connue et qui sont considérés comme étant des produits dérivés directs, ne permet pas d'établir la présence d'une activité inventive dans les dites revendications (Art. 33(3) PCT).
3. L'objet des revendications **16-18** est considéré comme nouveau et inventif, car le document D2 ne décrit pas ni ne suggère l'utilisation potentielle de la séquence nucléotidique décrite dans le dit document pour exprimer un gène hétérologue comprenant une étape d'inhibition de l'expression ou d'inactivation du polynucléotide décrit dans D2 et dans la présente demande.

SECTION VIII

La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées à l'Article 6 PCT: L'objet des revendications 19-20 recouvre des organismes hôtes transformés incluant des êtres humains. La formulation des dites revendications devrait en conséquence être modifiée.

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH 99040 G1	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA 416)	
International application No PCT/FR00/02052	International filing date (<i>day month year</i>) 13 July 2000 (13.07.00)	Priority date (<i>day month year</i>) 16 July 1999 (16.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/00		
Applicant AVENTIS CROPS SCIENCE S.A.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input checked="" type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 09 February 2001 (09.02.01)	Date of completion of this report 13 September 2001 (13.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA EP	Authorized officer
Facsimile No	Telephone No

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT FR00 02052

I. Basis of the report

1 With regard to the **elements** of the international application *

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description
pages 1-24 as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims.
pages 1-22 as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings
pages 1-1 as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages 1-6 as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2 With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and or 55.3).

3 With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4 ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets fig. _____

5 ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)) **

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT FR00 02052

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested
- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed
- ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed

2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date

3. Additional observations, if necessary:

SEE SUPPLEMENTAL SHEET

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No
PCT/FR 90/C2052

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II.

An official copy of the two priority documents FR9909417 and FR0001006 relating to the present application has been provided by the applicant in response to the first written opinion, thereby allowing the validity of the claimed priorities to be established.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT/FR 00/02052

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement

1 Statement

Novelty (N)	Claims	12-22	YES
	Claims	1-11	NO
Inventive step (IS)	Claims	16-18	YES
	Claims	12-15, 19-22	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-22	YES
	Claims		NO

2 Citations and explanations

Reference is made to the following document:

D1: DATABASE EMBL [on-line] ACCESSION NO: AB025633, 9 April 1999 (1999-04-09) NAKAMURA, Y.: 'Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone: MQM1.' XP002157926

The present application does not meet the PCT requirements for the following reasons:

- Document D2 describes a nucleotide sequence including a sequence exhibiting 100% identity over 3278 nt with SEQ ID N°1. The putative protein derived therefrom has a sequence exhibiting 100% identity with SEQ ID N°3. Therefore, the subject matter of Claims 1-11 is clearly anticipated by D2 and said claims are neither novel nor inventive (PCT Article 33(2) and 3).
- The subject matter of Claims 12-13, and of 14-15, which refer back thereto, simply relates to directly derived products that are obvious alternatives for a person skilled in the art and do not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT/FR 00/02051

Claims 14 and 15, which relate to a vector including a known polynucleotide or a transformation method based on the integration of a known polynucleotide, in so far as they refer back to Claims 1-9 and 10, are not considered to be inventive (PCT Article 33(3)).

The subject matter of Claims 19-22, which simply relate to host organisms transformed with a known sequence, and that are considered to be directly derived products, cannot serve as a basis for recognising an inventive step in said claims (PCT Article 33(3)).

3. The subject matter of Claims 16-18 is considered to be novel and inventive, since document D2 neither describes nor suggests the potential use of the nucleotide sequence described in said document for expressing a heterologous gene, including a step for inhibiting the expression of or inactivating the polynucleotide described in D2 and in the present application.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/02050

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The present application does not meet the requirements of PCT Article 6: the subject matter of Claims 19-20 covers transformed host organisms, including human beings. The wording of said claims should therefore be modified.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
25 janvier 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/05951 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/29, 15/82,
C07K 14/415, C12Q 1/68, A01H 5/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR00/02052

(22) Date de dépôt international : 13 juillet 2000 (13.07.2000)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
99/09417 16 juillet 1999 (16.07.1999) FR
00/01006 26 janvier 2000 (26.01.2000) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : AVEN-
TIS CROPS SCIENCE S.A. [FR/FR]; 55, avenue René
Cassin, F-69009 Lyon (FR). INSTITUT NATIONAL
RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de
l'Université, F-75341 Paris Cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BECLIN,
Christophe [FR/FR]; 57, rue du Port Royal, F-78470
St-Rémy-les-Chevreuses (FR). ELMAYAN, Taline
[FR/FR]; 8, rue Pierre Palliot, F-21000 Dijon (FR).
VAUCHERET, Hervé [FR/FR]; 3, rue de Wahlbach,
F-68510 Rantzwiller (FR).

(74) Représentant commun : AVENTIS CROPS SCIENCE
S.A.; Département Propriété Industrielle, 14-20, rue Pierre
Baizet, Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 9 août 2001

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

WO 01/05951 A3

(54) Title: NOVEL SGS3 PLANT GENE AND USE THEREOF

(54) Titre : NOUVEAU GENE SGS3 DE PLANTE ET SON UTILISATION

(57) Abstract: The invention concerns novel polynucleotides comprising the SGS3 plant gene involved in post-transcriptional inactivation phenomena in transgenic plants and in the resistance of plants to viral infections, and its use for preparing genetically modified plants.

(57) Abrégé : La présente invention concerne de nouveaux polynucléotides comprenant le gène SGS3 de plante impliqué dans les phénomènes d'inactivation post-transcriptionnelle dans les plantes transgéniques et dans la résistance des plantes aux infections virales, et son utilisation pour la préparation de plantes génétiquement modifiées.

Nouveau gène *SGS3* de plante et son utilisation

La présente invention concerne un nouveau gène *SGS3* de plante et son utilisation pour la préparation de plantes génétiquement modifiées.

5 On connaît de l'état de la technique des méthodes permettant d'intégrer des gènes hétérologues dans le génome des plantes de différentes espèces. Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 10 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

Le niveau d'expression du gène hétérologue dépendra de différents facteurs, dont le 15 locus d'intégration du gène hétérologue dans le génome de la plante transformée et les phénomènes dits de "silencing". Il est en effet connu de l'état de la technique que l'expression d'un gène hétérologue dans une plante peut être inhibée totalement ou en partie dans la descendance des plantes transformées régénérées, quand bien même le dit gène s'exprime correctement dans la plante régénérée directement issue de la cellule 20 transformée. Les gènes hétérologues introduits peuvent parfois subir une inactivation épigénétique (inactivation ne s'accompagnant d'aucune modification de séquence). Lorsque les gènes présentent des homologues avec des gènes de l'organisme hôte, l'inactivation peut affecter également l'expression de ces gènes hôtes et engendrer des effets délétères pour l'organisme (co-inactivation). Deux mécanismes distincts 25 d'inactivation ont été mis en évidence chez les végétaux supérieurs, se traduisant soit par un blocage de la transcription (inactivation transcriptionnelle) soit par une dégradation des ARN (inactivation post-transcriptionnelle).

Ces phénomènes d'inactivation, révélés accidentellement par la transgénèse, reflètent certainement des processus fondamentaux du contrôle épigénétique de l'expression des 30 gènes, et leur étude constitue donc un moyen original d'accès à la compréhension des mécanismes de régulation mis en jeu au cours du développement des plantes. La mise en évidence de ces phénomènes soulève par ailleurs de nombreuses questions quant à l'utilisation de plantes transgéniques tant pour des programmes d'amélioration variétale que pour des études de physiologie moléculaire.

35 Ainsi, des plantes homozygotes monolocus obtenues avec un gène codant la protéine GUS sous le contrôle du promoteur CamV 35S (35S-UidA) ont présenté une inactivation du transgène quel que soit le nombre de copies du transgène insérées au locus. Le phénomène se met en place au cours du développement de chaque génération indiquant une réversibilité méiotique. Des plantes haploïdes issues de la culture d'anthers de 40 transformants homozygotes inactivés portant une seule copie du transgène ont montré une

réactivation du gène suivie d'une inactivation au cours du développement, suggérant que la méiose était nécessaire au déclenchement du processus de réactivation, mais que le déclenchement de l'inactivation au cours du développement ne nécessitait pas de fertilisation, et ne résultait pas de l'interaction entre différentes copies du transgène. Enfin, des expériences de run-on ont montré que le phénomène survenait au niveau post-transcriptionnel (Elmayan et Vaucheret, Plant J. 9:787-797, 1996).

En induisant une mutation des plantes transformées, il est possible, non seulement d'éliminer ces phénomènes d'inhibition, mais encore d'augmenter le niveau d'expression des gènes hétérologues dans cette plante mutée (Elmayan et al., 1998, Plant Cell 10:1747-1757, 1998).

On conçoit donc qu'il est aujourd'hui indispensable d'identifier les gènes impliqués dans l'inactivation post-transcriptionnelle afin d'améliorer d'une part la stabilité de l'expression des transgènes dans les plantes et d'autre part la production de protéines recombinantes dans les plantes. L'identification de ces gènes présente également un grand intérêt en raison de leur rôle dans la résistance des plantes aux infections virales.

On a maintenant isolé un nouveau gène de plante, dénommé *SGS3*, impliqué dans les phénomènes d'inactivation post-transcriptionnelle dans les plantes transgéniques et dans la résistance des plantes aux infections virales. L'inhibition de ce gène conduit à l'inhibition des phénomènes d'inactivation post-transcriptionnelle en particulier dans les plantes transgéniques comprenant un gène hétérologue codant pour un peptide ou une protéine particuliers, permettant un niveau d'expression dudit peptide ou de ladite protéine à un niveau particulièrement élevé. L'invention a également pour objet la surexpression du gène *SGS3* pour la préparation de plantes plus résistantes aux infections virales.

25

Description de la liste de séquences

SEQ ID NO.1: Gène *SGS3* d'*Arabidopsis thaliana*

SEQ ID NO. 2: ADNc du gène *SGS3* d'*Arabidopsis thaliana*

SEQ ID NO. 3: Polypeptide *SGS3* d'*Arabidopsis thaliana*

30

Description de l'invention

Polynucléotides *SGS3*

La présente invention concerne des polynucleotides *SGS3*, en particulier des polynucléotides comprenant un gène *SGS3* de plante. Préférentiellement, les polynucléotides de la présente invention comprennent la séquence codante d'un gène *SGS3* de plante. Le gène *SGS3* peut être isolé chez les plantes dicotylédones, comme *Arabidopsis*, le tabac, le colza, le tournesol, le soja, le coton, le trèfle, la lentille d'eau (*lemnae*) ou chez les plantes monocotylédones comme le riz, le maïs ou le blé. De manière avantageuse, le gène *SGS3* est isolé chez les plantes dicotylédones, en particulier les

40

crucifères comme *Arabidopsis* ou le colza. De préférence, les polynucléotides de l'invention comprennent un gène *SGS3* d'*Arabidopsis thaliana*.

Le terme "polynucléotides *SGS3*" désigne l'ensemble des polynucléotides de la présente invention, de préférence, les polynucléotides de la séquence génomique de *SGS3*,
5 les polynucléotides de la séquence de l'ADNc de *SGS3*, ainsi que les polynucléotides codant pour les polypeptides *SGS3* de la présente invention. Le terme "polynucléotides *SGS3*" désigne également des polynucléotides recombinants comprenant les dits polynucléotides.

Selon la présente invention, on entend par "polynucléotide" une chaîne
10 nucléotidique simple brin ou son complémentaire ou une chaîne nucléotidique double brin pouvant être de type ADN ou ARN. De préférence, les polynucléotides de l'invention sont de type ADN, notamment d'ADN double brin. Le terme "polynucléotide" désigne également les oligonucléotides et les polynucléotides modifiés.

Les polynucléotides de la présente invention sont isolés ou purifiés de leur
15 environnement naturel. De préférence, les polynucléotides de la présente invention peuvent être préparés par les techniques classiques de biologie moléculaire telles que décrites par Sambrook et al. (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 1989) ou par synthèse chimique.

L'invention comprend des polynucléotides de la séquence génomique du gène
20 *SGS3*. Cette séquence génomique comprend 5 exons (positions 696-1658, 1732-2023, 2135-2379, 2482-2648, 2739-2949 de la SEQ ID NO. 1), 4 introns (positions 1659-1731, 2024-2134, 2380-2481, 2649-2738 de la SEQ ID NO.1) et des séquences régulatrices en 5' et en 3'. Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, les polynucléotides de la séquence génomique de *SGS3* comprennent un polynucléotide choisi parmi les
25 polynucléotides suivants:

- a) le polynucléotide de la SEQ ID NO.1,
- b) un polynucléotide comprenant au moins un exon de la SEQ ID NO.1;
- c) un polynucléotide comprenant une combinaison d'exons de la SEQ ID NO.1.

La présente invention concerne également un polynucléotide comprenant une
30 séquence régulatrice en 5' ou en 3' du gène *SGS3*. Dans un premier mode de réalisation, l'invention concerne un polynucléotide de régulation en 5' comprenant le polynucléotide dont la séquence est comprise entre la position 1 et la position 695 de la SEQ ID NO. 1. Dans un deuxième mode de réalisation, l'invention concerne un polynucléotide de régulation en 3' comprenant le polynucléotide dont la séquence est comprise entre la
35 position 2950 et la position 3275 de la SEQ ID NO. 1.

L'invention a également pour objet un promoteur du gène *SGS3* d'*Arabidopsis thaliana*. De préférence, le promoteur du gène *SGS3* comprend un polynucléotide dont la séquence est comprise entre la position 1 et la position 695 de la SEQ ID NO. 1. Dans un autre mode de réalisation de l'invention, le promoteur du gène *SGS3* comprend un fragment

biologiquement actif d'un polynucléotide dont la séquence est comprise entre la position 1 et la position 695 de la SEQ ID NO. 1.

Par "fragment biologiquement actif" on entend ci-dessus un polynucléotide ayant une activité promotrice et de préférence une activité promotrice dans les plantes. Les techniques permettant d'établir l'activité promotrice d'un polynucléotide sont bien connues de l'homme du métier. Ces techniques impliquent classiquement l'utilisation d'un vecteur d'expression comprenant dans le sens de la transcription le polynucléotide à tester et un gène rapporteur (voir Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 1989).

L'invention s'étend également aux polynucléotides comprenant un polynucléotide choisi parmi les polynucléotides suivants:

- a) un polynucléotide homologue à un polynucléotide dont la séquence est comprise entre la position 1 et la position 695 de la SEQ ID NO. 1,
- b) un polynucléotide capable de s'hybrider de manière sélective à un polynucléotide dont la séquence est comprise entre la position 1 et la position 695 de la SEQ ID NO. 1.

De préférence, ces polynucléotides ont une activité promotrice dans les cellules végétales et les plantes.

L'invention concerne aussi une séquence terminatrice du gène *SGS3* d'*Arabidopsis thaliana*. De préférence, la séquence terminatrice du gène *SGS3* comprend un polynucléotide dont la séquence est comprise entre la position 2950 et la position 3275 de la SEQ ID NO. 1. Dans un autre mode de réalisation de l'invention, la séquence terminatrice du gène *SGS3* comprend un fragment biologiquement actif d'un polynucléotide dont la séquence est comprise entre la position 2950 et la position 3275 de la SEQ ID NO. 1.

L'invention concerne aussi des polynucléotides de l'ADNc de *SGS3*. De manière préférée, les polynucléotides de la séquence codante d'un gène *SGS3* de plante comprennent des polynucléotides de la SEQ ID NO. 2.

L'invention s'étend également aux polynucléotides comprenant un polynucléotide choisi parmi les polynucléotides suivants:

- a) un polynucléotide homologue à un polynucléotide selon la SEQ ID No. 1 ou la SEQ ID No. 2;
- b) un polynucléotide capable de s'hybrider de manière sélective à un polynucléotide selon la SEQ ID No. 1 ou la SEQ ID No. 2.

De préférence, les polynucléotides homologues à un polynucléotide de référence ou s'hybridant de manière sélective à un polynucléotide de référence conservent la fonction de la séquence de référence. Les polynucléotides de la présente invention codent de préférence pour un polypeptide essentiel pour l'inactivation post-transcriptionnelle dans les plantes. Préférentiellement, les polynucléotides de la présente invention restaurent un mutant *sgs3* d'*Arabidopsis thaliana*. Ces mutants et leur méthode d'obtention sont décrits dans Elmayan et al. (Plant Cell, 10:1747-1757, 1998). D'autres méthodes permettant de construire des mutants d'*Arabidopsis thaliana* dans lesquels le gène *SGS3* est inactivé sont

bien connues de l'homme du métier. Les méthodes d'obtention de mutants d'*Arabidopsis thaliana* sont largement décrites dans la littérature.

Par "homologue" on entend selon l'invention un polynucléotide présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport à la séquence de référence. Ces modifications peuvent être des délétions, des additions ou des substitutions d'un ou plusieurs nucléotides de la séquence de référence. De manière avantageuse, le pourcentage d'homologie sera d'au moins 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% et de préférence d'au moins 98% et plus préférentiellement d'au moins 99% par rapport à la séquence de référence. Les méthodes de mesure et d'identification des homologies entre les séquences d'acides nucléiques sont bien connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple les programmes PILEUP ou BLAST (notamment Altschul et al., J.Mol.Evol., 36:290-300, 1993; Altschul et al., J.Mol.Biol., 215 :403-10, 1990). L'invention concerne donc des polynucléotides comprenant des polynucléotides présentant au moins 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% et de préférence au moins 98% et plus préférentiellement au moins 99% d'homologie avec les polynucléotides SGS3, les polynucléotides de la SEQ ID NO.1 ou les polynucléotides de la SEQ ID NO. 2. De préférence l'invention concerne un polynucléotide comprenant un polynucléotide d'au moins 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 nucléotides présentant au moins 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% et de préférence au moins 98% et plus préférentiellement au moins 99% d'homologie avec les polynucléotides SGS3, les polynucléotides de la SEQ ID NO.1 ou les polynucléotides de la SEQ ID NO. 2. De préférence, ces homologues conservent la fonction de la séquence de référence.

Par "séquence capable de s'hybrider de manière sélective", on entend selon l'invention les séquences qui s'hybrident avec la séquence de référence à un niveau supérieur au bruit de fond de manière significative. Le niveau du signal généré par l'interaction entre la séquence capable de s'hybrider de manière sélective et les séquences de référence est généralement 10 fois, de préférence 100 fois plus intense que celui de l'interaction des autres séquences d'ADN générant le bruit de fond. Les conditions d'hybridation stringentes permettant une hybridation sélective sont bien connues de l'homme du métier. En général la température d'hybridation et de lavage est inférieure d'au moins 5°C au T_m de la séquence de référence à un pH donné et pour une force ionique donnée. Typiquement la température d'hybridation est d'au moins 30°C pour un polynucléotide de 15 à 50 nucléotides et d'au moins 60°C pour un polynucléotide de plus de 50 nucléotides. A titre d'exemple, l'hybridation est réalisée dans le tampon suivant: 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA, 500 µg/ml denatured salmon sperm DNA. Les lavages sont par exemple réalisés successivement à faible stringence dans un tampon 2X SSC, 0,1%SDS, à moyenne stringence dans un tampon 0,5X SSC, 0,1%SDS et à forte stringence dans un tampon 0.1X SSC, 0,1%SDS. L'hybridation peut bien entendu être effectuée selon d'autres méthodes usuelles bien connues de l'homme du métier (voir notamment Sambrook et al., Molecular

Cloning : A Laboratory Manual, 1989). L'invention concerne donc des polynucléotides comprenant un polynucléotide capable de s'hybrider de manière sélective avec le polynucléotide de la SEQ ID NO.1 ou le polynucléotide de la SEQ ID NO. 2. De préférence, l'invention concerne un polynucléotide comprenant un polynucléotide d'au moins 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 nucléotides capable de s'hybrider de manière sélective avec le polynucléotide de la SEQ ID NO.1 ou le polynucléotide de la SEQ ID NO. 2. Préférentiellement, ces polynucléotides s'hybridant de manière sélective à un polynucléotide de référence conservent la fonction de la séquence de référence.

La présente invention a également pour objet des polynucléotides antisens permettant l'inhibition de l'expression d'un gène *SGS3* de plante. Les polynucléotides antisens s'hybrident spécifiquement à l'ARNm d'un gène *SGS3* de plante interférant ainsi avec l'expression de ce gène. Les techniques d'inhibition de l'expression d'une protéine par un polynucléotide antisens sont bien connues de l'homme du métier et largement décrites dans la littérature notamment par Judelson et al. (*Gene*, 133:63-69,1993) ainsi que par Prokish et al. (*Mol.Gen.Genet.* 256:104-114, 1997).

Les polynucléotides antisens de la présente invention s'hybrident à l'ARNm d'un gène *SGS3* de plante sur toute sa longueur ou seulement à une partie de l'ARNm d'un gène *SGS3* de plante. Les polynucléotides antisens de la présente invention peuvent être parfaitement complémentaires à l'ARNm d'un gène *SGS3* de plante ou suffisamment homologues pour permettre l'appariement et l'inhibition de l'expression d'un gène *SGS3* de plante.

La présente invention a donc également pour objet des polynucléotides comprenant un polynucléotide antisens d'un gène *SGS3* de plante et préférentiellement un polynucléotide antisens de la séquence codante du gène *SGS3* de la SEQ ID NO. 2. Préférentiellement, les polynucléotides antisens de la présente invention sont dérivés d'un polynucléotide de la SEQ ID NO. 2. Selon un premier mode de réalisation, les polynucléotides antisens de la présente invention comprennent le polynucléotide de la SEQ ID No.2. Selon un deuxième mode de réalisation, les polynucléotides antisens de la présente invention comprennent un fragment d'au moins 100 nucléotides, de préférence d'au moins 500 nucléotides et préférentiellement d'au moins 1000 nucléotides de la SEQ ID NO.2. Selon un troisième mode de réalisation, les polynucléotides antisens de la présente invention comprennent un polynucléotide présentant au moins 85%, 90%, 95% et de préférence au moins 98% et plus préférentiellement au moins 99% d'homologie avec un polynucléotide de la SEQ ID NO. 2. Selon un autre mode de réalisation les polynucléotides antisens de la présente invention comprennent un polynucléotide présentant au moins 85%, 90%, 95% et de préférence au moins 98% et plus préférentiellement au moins 99% d'homologie avec un fragment d'au moins 100 nucléotides, de préférence d'au moins 500 nucléotides et préférentiellement d'au moins 1000 nucléotides de la SEQ ID NO.2.

De préférence, les polynucléotides antisens de la présente invention inhibent spécifiquement l'expression d'un gène *SGS3* chez les plantes.

Selon un mode de réalisation préféré, les polynucléotide antisens de la présente invention sont exprimés dans les cellules végétales ou les plantes à partir d'une cassette d'expression.

La présente invention concerne l'utilisation d'un polynucléotide ou d'un fragment
5 d'un polynucléotide de la SEQ ID NO. 1 et de la SEQ ID NO. 2 selon l'invention pour l'identification du gène *SGS3* dans d'autres plantes. Le clonage s'effectue par exemple par criblage de banques d'ADNc ou de banques d'ADN génomique avec un polynucléotide ou un fragment d'un polynucléotide de la SEQ ID NO.1 et de la SEQ ID NO.2. Ces banques
10 peuvent également être criblés par PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques ou dégénérés dérivés de la SEQ ID NO.1 ou de la SEQ ID NO.2. Les techniques de construction et de criblage de ces banques sont bien connues de l'homme du métier (voir notamment Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 1989). Des gènes *SGS3* de plante peuvent également être identifiés dans les bases de données par BLAST nucléotidique ou protéique à l'aide des SEQ ID NO. 1-3.

15 De préférence, on vérifie que les gènes clonés assurent la même fonction que le gène *SGS3* d'*Arabidopsis thaliana* par introduction des gènes identifiés dans des mutants *SGS3* et par test de restauration de l'inactivation post-transcriptionnelle (voir ci-dessous). L'invention a également pour objet des polynucléotides comprenant un polynucléotide codant pour un polypeptide selon l'invention.

20

Polypeptides SGS3

La présente invention concerne également des polypeptides *SGS3*. Le terme "polypeptides *SGS3*" désigne l'ensemble des polypeptides de la présente invention ainsi que les polypeptides pour lesquels codent les polynucléotides de la présente invention. Le
25 terme "polypeptides *SGS3*" désigne également des protéines de fusion, des protéines recombinantes ou des protéines chimères comprenant ces polypeptides. Dans la présente description le terme "polypeptide" désigne également des protéines et des peptides ainsi que des polypeptides modifiés.

Les polypeptides de l'invention sont isolés ou purifiés de leur environnement naturel.
30 Les polypeptides peuvent être préparés au moyen de différents procédés. Ces procédés sont notamment la purification à partir de sources naturelles telles que des cellules exprimant naturellement ces polypeptides, la production de polypeptides recombinants par des cellules hôtes appropriées et leur purification ultérieure, la production par synthèse chimique ou, enfin, une combinaison de ces différentes approches. Ces différents procédés
35 de production sont bien connus de l'homme du métier. Ainsi, les polypeptides *SGS3* de la présente invention peuvent être isolés à partir de plantes exprimant des polypeptides *SGS3*. De préférence les polypeptides *SGS3* de la présente invention sont isolés à partir d'organisme hôtes recombinants exprimant un polypeptide *SGS3* hétérologue ou exprimant un polypeptide *SGS3* naturel sous le contrôle d'un promoteur hétérologue. Ces organismes

sont préférentiellement choisis parmi les bactéries, les levures, les champignons, les cellules animales, les cellules végétales ou les plantes.

La présente invention a pour objet un polypeptide de séquence SEQ ID NO.3 ainsi qu'un polypeptide comprenant un polypeptide de séquence SEQ ID NO. 3. L'invention
5 comprend également des polypeptides comprenant un fragment ou un homologue d'un polypeptide SGS3 et plus particulièrement du polypeptide de la SEQ ID NO. 3.

Le terme "fragment" d'un polypeptide désigne un polypeptide comprenant une partie mais pas la totalité du polypeptide dont il est dérivé. L'invention concerne un polypeptide comprenant un fragment d'au moins 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 acides aminés d'un
10 polypeptide de la SEQ ID NO.3. De préférence, ces fragments conservent au moins une activité biologique du polypeptide dont ils sont dérivés. Préférentiellement, cette activité concerne l'inactivation post-transcriptionnelle chez les plantes. De manière préférée, les polypeptides de la présente invention restaurent un mutant *sgs3* d'*Arabidopsis thaliana*.

Le terme "homologue" désigne un polypeptide selon l'invention désigne un
15 polypeptide pouvant présenter une délétion, une addition ou une substitution d'au moins un acide aminé. L'invention a pour objet un polypeptide présentant au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% et préférentiellement 99% d'acides aminés identiques avec un polypeptide de la SEQ ID NO. 3. De préférence, ces polypeptides homologues conservent la même activité biologique. Préférentiellement, cette activité concerne l'inactivation post-
20 transcriptionnelle chez les plantes. De manière préférée, les polypeptides de la présente invention restaurent un mutant *sgs3* d'*Arabidopsis thaliana*.

Cassettes d'expression

Le gène *SGS3* peut être exprimé ou sur-exprimé dans différents organismes hôtes
25 tels que les plantes. La présente invention concerne notamment la sur-expression du gène *SGS3* dans les plantes ou les cellules végétales pour améliorer leur résistance aux virus. Le gène *SGS3* peut être exprimé dans un organisme hôte sous le contrôle du promoteur *SGS3* de la présente invention ou sous le contrôle d'un promoteur hétérologue et de préférence sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans les plantes. Selon un mode de
30 réalisation de l'invention, un polynucléotide codant pour un polypeptide *SGS3* est inséré dans une cassette d'expression en utilisant des techniques de clonage bien connues de l'homme du métier. Cette cassette d'expression comprend les éléments nécessaires à la transcription et à la traduction des séquences codant pour le polypeptide *SGS3*.
Avantageusement, cette cassette d'expression comprend à la fois des éléments permettant
35 de faire produire un polypeptide *SGS 3* par une cellule hôte et des éléments nécessaires à la régulation de cette expression. Dans un premier mode de réalisation, les cassettes d'expression selon l'invention comprennent, dans le sens de la transcription, un promoteur fonctionnel dans un organisme hôte, un gène *SGS3* de plante ou la séquence codante d'un gène *SGS3* de plante et une séquence terminatrice dans ledit organisme hôte. Dans un
40 autre mode de réalisation, les cassettes d'expression selon l'invention comprennent, dans le

- sens de la transcription, un promoteur fonctionnel dans un organisme hôte, un polynucléotide codant pour un polypeptide SGS3 et une séquence terminatrice dans ledit organisme hôte. Préférentiellement, la cassette d'expression comprend, dans le sens de la transcription, un promoteur fonctionnel dans un organisme hôte, un polynucléotide choisi
- 5 parmi les polynucléotides suivants:
- a) un polynucléotides codant pour un polypeptide SGS3 de la SEQ ID NO. 3, pour un homologue ou pour un fragment d'un polypeptide de la SEQ ID NO.3;
 - b) un polynucléotide de la SEQ ID NO. 1;
 - c) un polynucléotide de la SEQ ID NO. 2;
 - 10 d) un polynucléotide homologue à un polynucléotide tel que défini en b) ou c);
 - e) un polynucléotide capable de s'hybrider de manière spécifique à un polynucléotide tel que défini en b) ou c);
 - f) un polynucléotide comprenant un fragment d'un polynucléotide tel que défini en b), c), d) et e).

15 et une séquence terminatrice dans ledit organisme hôte.

Dans un autre mode de réalisation, les cassettes d'expression de la présente invention permettent l'expression d'un polynucléotide antisens pour l'inhibition de l'expression du gène *SGS3* dans une plante. Pour l'expression d'un polynucléotide antisens dans une plante les cassettes d'expression selon l'invention comprennent, dans le sens de la transcription, un

20 promoteur fonctionnel dans un organisme hôte, un polynucléotide antisens de la séquence codante d'un gène *SGS3* de plante et une séquence terminatrice fonctionnelle dans ledit organisme hôte. De préférence, les cassettes d'expression selon l'invention comprennent, dans le sens de la transcription, un promoteur fonctionnel dans un organisme hôte, un polynucléotide antisens de la séquence codante du gène *SGS3* de la SEQ ID NO. 2 et une

25 séquence terminatrice fonctionnelle dans ledit organisme hôte. Préférentiellement, les polynucléotides antisens de la présente invention sont exprimés sous le contrôle d'un promoteur inductible.

Dans un mode de réalisation préféré, l'invention a pour objet une cassette d'expression comprenant dans le sens de la transcription:

- 30 a) un promoteur fonctionnel dans un organisme hôte; et
- b) un polynucléotide *SGS3* selon l'invention en orientation antisens ; et
- c) une séquence terminatrice dans ledit organisme hôte.

Le promoteur *SGS3* peut être utilisé pour exprimer un gène hétérologue dans un organisme hôte et notamment dans les cellules végétales ou dans les plantes. L'invention a

35 donc également pour objet des cassettes d'expression comprenant le promoteur d'un gène *SGS3* de plante associé de manière fonctionnelle à une séquence codant pour une protéine hétérologue, permettant l'expression de ladite protéine dans les cellules végétales ou les plantes. Dans un mode de réalisation, la cassette d'expression selon l'invention comprend, dans le sens de la transcription, le promoteur *SGS3* d'*Arabidopsis thaliana*, la séquence

40 codante pour la protéine hétérologue et une séquence terminatrice fonctionnelle dans les

cellules végétales et les plantes. De préférence, la cassette d'expression selon l'invention comprend, dans le sens de la transcription, un polynucléotide dont la séquence est comprise entre la position 1 et la position 695 de la SEQ ID NO. 1 ou un fragment biologiquement actif du polynucléotide dont la séquence est comprise entre la position 1 et la position 695 de la SEQ ID NO. 1, la séquence codant pour un polypeptide hétérologue et une séquence terminatrice fonctionnelle dans les cellules végétales et les plantes.

Les cassettes d'expression, selon la présente invention, peuvent en outre inclure toute autre séquence nécessaire à l'expression du gène d'intérêt, comme par exemple des éléments de régulation ou des séquences signal permettant l'adressage du polypeptide d'intérêt.

Les techniques de construction de ces cassettes d'expression sont largement décrites dans la littérature (voir notamment Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 1989).

La présente invention a également pour objet un polynucléotide comprenant une cassette d'expression selon l'invention et notamment un vecteur comprenant une cassette d'expression selon l'invention.

Avantageusement les cassettes d'expression selon la présente invention sont insérées dans un vecteur pour leur réplique ou pour la transformation d'un organisme hôte.

Certains éléments des cassettes d'expression selon l'invention sont illustrés ci-dessous à titre non limitatif.

Promoteurs

Tout type de séquence promotrice peut être utilisée dans les cassettes d'expression selon l'invention. Le choix du promoteur dépendra notamment de l'organisme hôte choisi pour l'expression du gène d'intérêt. La présente invention concerne plus particulièrement la transformation des plantes. Le choix du promoteur utilisé dans la cassette d'expression détermine l'expression temporelle et spatiale du gène d'intérêt. Certains promoteurs permettent une expression spécifique dans certains tissus de la plante (racines, feuilles ou graines par exemple) ou dans certaines cellules de la plante. Certains promoteurs permettent une expression constitutive alors que d'autres promoteurs sont au contraire inductibles. Comme séquence de régulation promotrice dans les plantes, on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur s'exprimant notamment dans les feuilles des plantes, comme par exemple des promoteurs dits constitutifs d'origine bactérienne, virale ou végétale ou encore des promoteurs dits lumière dépendants comme celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose- biscoxylase/oxygénase (RuBisCO) de plante ou tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. Parmi les promoteurs d'origine végétale on citera les promoteurs d'histone tels que décrits dans la demande EP 0 507 698, ou le promoteur d'actine de riz (US 5,641,876). Parmi les promoteurs d'un gène de virus de plante, on citera celui de la mosaïque du chou fleur (CAMV 19S ou 35S), ou le promoteur du circovirus (AU 689 311). On peut encore utiliser une séquence de régulation promotrice

spécifique de régions ou de tissus particuliers des plantes, et plus particulièrement des promoteurs spécifiques des graines (Datla et al., Biotechnology Ann. Rev. 3:269-296, 1997). On peut également employer un promoteur inductible avantageusement choisi parmi les promoteurs de phénylalanine ammoniac lyase (PAL), d'HMG-CoA reductase (HMG), de chitinases, de glucanases, d'inhibiteurs de protéinase (PI), de gènes de la famille PR1, de la nopaline synthase (nos) ou du gène vspB (US 5 670 349), le promoteur HMG2 (US 5 670 349), le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou le promoteur de l'acétyl-coenzyme A carboxylase synthase (ACC synthase) de pomme (WO 98/45445).

On pourra également utiliser le promoteur du gène *SGS3* d'*Arabidopsis thaliana*.

Séquences de régulation de l'expression

Dans les cassettes d'expression de la présente invention on peut utiliser toute séquence de régulation permettant d'augmenter le niveau d'expression de la séquence codante insérée dans ladite cassette d'expression. Selon l'invention, on peut notamment utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"). Parmi les séquences leader dérivées de virus on citera par exemple l'activateur du virus de la mosaïque du tabac (TMV) décrit dans la demande WO 87/07644, ou l'activateur du virus du tabac (TEV). Différentes séquences dérivées d'introns de plantes peuvent également être utilisées pour augmenter le niveau d'expression du gène d'intérêt notamment chez les plantes monocotylédones. On citera par exemple l'intron I du gène de maïs *Adhl* (Callis et al., Genes Develop., 1:1183-1200, 1987).

Séquences terminatrices

Une grande variété de séquences terminatrices sont utilisables dans les cassettes d'expression selon l'invention. Ces séquences permettent la terminaison de la transcription et la polyadénylation de l'ARNm. Toute séquence terminatrice fonctionnelle dans l'organisme hôte sélectionné peut être utilisée. Pour l'expression dans les plantes on peut notamment utiliser le terminateur *nos* d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore des séquences terminatrices d'origine végétale, comme par exemple le terminateur d'histone (voir EP 0 633 317), le terminateur CaMV 35 S et le terminateur *tml*. Ces séquences terminatrices sont utilisables dans les plantes monocotylédones et dicotylédones.

La séquence terminatrice du gène *SGS3* d'*Arabidopsis thaliana* est un autre exemple de séquence terminatrice utilisable dans les cassettes d'expression selon l'invention.

Gènes hétérologues

Tout gène d'intérêt peut être exprimé dans un organisme hôte sous le contrôle d'un promoteur *SGS3*. De préférence, le promoteur *SGS3* est utilisé pour l'expression d'un gène hétérologue dans des cellules de plante ou dans une plante. Les gènes d'intérêt pouvant être

exprimés dans les plantes sous le contrôle d'un promoteur *SGS3* sont plus largement illustrés ci-dessous.

Vecteurs

5 La présente invention concerne également des vecteurs de transformation ou d'expression comprenant au moins un polynucléotide *SGS3* ou une cassette d'expression selon la présente invention. Les vecteurs de la présente invention sont notamment utilisés pour transformer un organisme hôte et pour exprimer un polypeptide *SGS3* ou un polynucléotide *SGS3* dans ledit organisme hôte. L'organisme hôte est par exemple une
10 bactérie, une levure, un champignon, une cellule de plante ou une plante. Ce vecteur peut notamment être constitué par un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus dans lequel est inséré un polynucléotide *SGS3* ou une cassette d'expression selon l'invention. De manière générale, tout vecteur capable de se maintenir, de s'autorépliquer ou de se propager dans une cellule hôte afin d'induire l'expression d'un polynucléotide ou d'un polypeptide
15 peut être utilisé.

Les techniques de construction de ces vecteurs et les techniques d'insertion d'une séquence appropriée dans ces vecteurs sont largement décrites dans la littérature (voir notamment Sambrook et al., *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 1989).

Avantageusement, les vecteurs selon l'invention comprennent au moins une origine
20 de réplication. De manière préférée, les vecteurs de l'invention comprennent également au moins un marqueur de sélection et de préférence un marqueur de sélection utilisable dans les cellules végétales ou dans les plantes. Parmi les marqueurs de sélection, on peut citer les gènes de résistance aux antibiotiques tel que le gène *nptII* pour la résistance à la kanamycine (Bevan et al., *Nature* 304:184-187, 1983) et le gène *hph* pour la résistance à
25 l'hygromycine (Gritz et al., *Gene* 25:179-188, 1983). On citera également les gènes de tolérance aux herbicides tel que le gène *bar* (White et al., *NAR* 18:1062, 1990) pour la tolérance au bialaphos, le gène EPSPS (US 5,188,642) pour la tolérance au glyphosate ou encore le gène HPPD (WO 96/38567) pour la tolérance aux isoxazoles. On pourra également utiliser les gènes codant pour des enzymes rapporteurs facilement identifiables
30 comme l'enzyme GUS ou des gènes codant pour des pigments et des enzymes régulant la production de pigments dans les cellules transformées. De tels gènes marqueurs de sélection sont notamment décrits dans les demandes de brevet EP 242 236, EP 242 246, GB 2 197 653, WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

Avantageusement, ces vecteurs sont utilisés pour la transformation d'un organisme
35 hôte. L'homme du métier choisira les vecteurs de transformation appropriés notamment en fonction de l'organisme hôte à transformer et en fonction de la technique de transformation mise en œuvre.

Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui peut être employé pour la transformation des plantes développées et
40 contenant en outre ses propres éléments de réplication et d'expression. De manière

préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un plasmide.

De nombreux vecteurs ont été développés pour la transformation des plantes avec *Agrobacterium tumefaciens*. D'autres vecteurs sont utilisés pour les techniques de transformation ne reposant pas sur l'utilisation d'*Agrobacterium*. Ces vecteurs sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

Transformation

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des organismes hôtes, en particulier des cellules végétales avec un polynucléotide SGS3, une cassette d'expression ou un vecteur de transformation ou d'expression selon l'invention.

Selon la présente invention la transformation de l'organisme hôte peut être obtenue par tout moyen connu approprié, les techniques de transformation et notamment de transformation des plantes sont amplement décrites dans la littérature spécialisée. Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071, WO 95/06128 et WO 99/19497.

Certaines techniques utilisent *Agrobacterium* notamment pour la transformation des dicotylédones. Une série de méthodes consistent à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*. D'autres méthodes consistent à bombardier des cellules, des protoplastes ou des tissus avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. D'autres méthodes peuvent également être utilisées telles que la micro-injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG.

L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

Organismes hôtes

La présente invention concerne également un organisme hôte transformé avec un polynucléotide SGS3, une cassette d'expression ou un vecteur selon l'invention.

Par organisme hôte, on entend en particulier selon l'invention tout organisme mono ou pluricellulaire, inférieur ou supérieur, en particulier choisi parmi les bactéries, les levures, les champignons ou les cellules végétales et les plantes. De manière avantageuse, les bactéries sont choisies parmi *Escherichia coli*, les levures sont choisies parmi *Pichia pastoris* et *Saccharomyces cerevisiae*, les champignons sont choisis parmi *Aspergillus niger*. De manière préférentielle, l'organisme hôte est une cellule végétale ou une plante.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, l'orge, le sorgho, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave, le tabac, le coton, le trèfle, la lentille d'eau (*lemnae*) etc.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'organisme hôte comprend au moins un autre gène hétérologue codant pour un peptide, un polypeptide ou une protéine d'intérêt. Le polynucléotide comprenant un polynucléotide *SGS3* selon l'invention et le ou les autres gènes hétérologues peuvent avoir été introduits dans l'organisme hôte simultanément au moyen d'un même vecteur les comprenant, ou au moyen de plusieurs vecteurs, ou de manière séquentielle au moyen de plusieurs vecteurs, ou encore par croisement de plusieurs organismes hôtes, chacun comprenant un gène hétérologue.

Par gène hétérologue, on entend selon l'invention tout gène introduit de manière artificielle dans l'organisme hôte, et plus particulièrement intégré de manière artificielle dans son génome, les méthodes permettant cette introduction ou intégration pouvant être celles décrites précédemment, le contenu des références citées étant incorporé ici par référence.

Le gène hétérologue, autre que les polynucléotides *SGS3* selon l'invention, peut être un gène comprenant une séquence codante et les éléments de régulation en 5' et 3' de ladite séquence codante non modifiés par rapport au gène naturel, réintroduit de manière artificielle dans le génome d'un organisme hôte pouvant être de la même espèce que celui d'où le gène a été isolé, ou d'une espèce différente. Le gène hétérologue peut également être un gène chimère ou une cassette d'expression comprenant une séquence codante d'origine, végétale, bactérienne, fongique, virale ou animale, sous le contrôle d'éléments de régulation fonctionnels dans l'organisme hôte, différents de ceux naturellement liés fonctionnellement à la séquence codante.

La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules transformées telles que définies ci-dessus, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées et leur descendance. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépend de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les références ci-dessus.

La présente invention concerne aussi les plantes génétiquement modifiées dans le génome desquelles un polynucléotide *SGS3* ou une cassette d'expression selon l'invention sont intégrés de manière stable et transmissible par reproduction sexuée.

La présente invention concerne également des plantes obtenues par croisement des plantes régénérées ci-dessus avec d'autres plantes. Elle concerne aussi les graines de plantes transformées.

Mutants *sgs3*

L'invention concerne également des mutants *sgs3* dans lesquels le gène *SGS3* est inactivé. L'inactivation de ce gène conduit à l'inhibition des phénomènes d'inactivation post-transcriptionnelle chez ces mutants.

L'inactivation du gène *SGS3* dans les plantes peut être obtenue au moyen de différentes techniques de mutagenèse, de mutagenèse dirigée, de "gene machine" ou par des techniques de recombinaison homologue (Kempin, S.A. et al., Targeted disruption in *Arabidopsis*, Nature 389:802-803, 1997). Ces techniques sont bien connues de l'homme du métier. Parmi les techniques de mutagenèse on citera les techniques de mutagenèse chimique. On citera également les techniques de mutagenèse utilisant des éléments transposables permettant l'inactivation de gènes par insertion. Lorsque les techniques de mutagenèse utilisées ne permettent pas de spécifiquement inactiver le gène *SGS3*, les mutants obtenus sont criblés pour identifier les mutants affectés dans le gène *SGS3*. Ce criblage peut être un criblage phénotypique ou un criblage basé sur l'amplification et le séquençage du gène *SGS3* dans les mutants selon des techniques décrites dans la littérature. Parmi les techniques de mutagenèse dirigée on citera la chimeraplasty (US 6,010,907).

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention des mutants sont obtenus selon le procédé décrit par Elmayan et al. (Plant Cell, 10:1747-1757, 1998) par traitement de graines avec une solution d'EMS (ethyl methanesulfonate) à 0,4%. Les mutants sont ensuite analysés pour identifier les mutants affectés dans le gène *SGS3*. Ce criblage peut par exemple s'effectuer par PCR.

La présente invention concerne également l'utilisation de mutants *SGS3* pour l'identification de gènes *SGS3* dans d'autres espèces végétales telles que par exemple le tabac, le colza, le tournesol, le soja, le coton, le riz, le maïs, le sorgho, l'orge ou le blé. Les homologues fonctionnels de *SGS3* chez d'autres espèces sont identifiés par complémentation des mutants *sgs3* selon l'invention. Un polynucléotide qui restaure le phénotype sauvage d'inactivation post-transcriptionnelle est cloné. La séquence de ce polynucléotide est ensuite déterminée afin d'identifier les éléments constitutifs du gène cloné.

Inhibition/Inactivation de *SGS3* et expression de gènes hétérologues dans les plantes

Le développement des techniques de transferts génétiques a permis l'expression de gènes dans les plantes notamment en vue de l'amélioration de leur propriétés agronomiques ou pour la production de protéines d'intérêt. Cependant, les phénomènes d'inactivation post-transcriptionnelle constituent un obstacle important à la stabilité de l'expression des transgènes dans les plantes. Ces phénomènes de suppression de l'expression du transgène sont particulièrement fréquents dans le cadre de transgènes fortement exprimés. La présente invention concerne un nouveau gène de plante *SGS3*. L'inhibition ou l'inactivation de ce gène *SGS3* dans les plantes provoquent une inhibition

du phénomène d'inactivation post-transcriptionnelle et permet donc d'obtenir des plantes dans lesquelles l'expression des gènes hétérologues est plus stable ainsi que des plantes dans lesquelles le niveau d'expression des gènes hétérologues est plus élevé.

Inactivation/inhibition du gène *SGS3* dans les plantes

- 5 Dans un premier mode de réalisation l'invention concerne un procédé pour exprimer un gène hétérologue dans une plante caractérisé en ce qu'il comprend la transformation de la plante avec le gène hétérologue et l'inhibition de l'expression du gène *SGS3* dans ladite plante.

De préférence, l'invention concerne un procédé pour exprimer un gène hétérologue dans une plante caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- 10 a) on transforme ladite plante avec ledit gène hétérologue; et
b) on inhibe l'expression d'un polynucléotide *SGS3* selon l'invention dans ladite plante.

Préférentiellement, l'inhibition de l'expression du gène *SGS3* comprend la transformation de la plante avec un polynucléotide comprenant un polynucléotide choisi
15 parmi les polynucléotides suivants:

- a) un polynucléotide antisens de la séquence codante d'un gène *SGS3* de plante;
b) un polynucléotide antisens de la séquence codante du gène *SGS3* de la SEQ ID

NO.2;

- c) une cassette d'expression comprenant, dans le sens de la transcription, un promoteur
20 fonctionnel dans un organisme hôte, un polynucléotide tel que défini en a) ou b) et une séquence terminatrice fonctionnelle dans ledit organisme hôte.

Dans un autre mode de réalisation l'invention concerne un procédé pour exprimer un gène hétérologue dans une plante caractérisé en ce qu'il comprend la transformation de la plante avec le gène hétérologue et l'inactivation de l'expression du gène *SGS3* dans ladite plante.

- 25 L'invention a également pour objet un procédé pour exprimer un gène hétérologue dans une plante comprenant les étapes suivantes:

- a) on transforme ladite plante avec ledit gène hétérologue;
b) on inactive l'expression d'un polynucléotide *SGS3* selon l'invention dans ladite plante.

Dans le cadre de la présente invention il est bien entendu que l'étape d'inactivation
30 ou d'inhibition du gène *SGS3* de plante et l'étape de transformation de la plante avec un gène hétérologue peuvent être réalisés simultanément sur une même plante ou de manière séquentielle ou encore par croisements de plusieurs plantes. Les procédés selon l'invention peuvent donc également comprendre des étapes de régénération des plantes, de multiplication asexuée ou de croisements des plantes.

35 Gènes hétérologues

Différents gènes hétérologues d'intérêt peuvent être exprimés dans les plantes dans lesquelles l'expression du gène *SGS3* est inhibé ou inactivé. De préférence, le gène hétérologue code pour des peptides, des protéines ou des enzymes. Il peut s'agir de protéines rapporteurs, des marqueurs de sélection ou de peptides ou de protéines d'intérêt

conférant à l'organisme hôte de nouvelles propriétés, plus particulièrement de nouvelles propriétés agronomiques pour les plantes transformées.

Parmi les gènes conférant de nouvelles propriétés agronomiques aux plantes transformées, on peut citer les gènes conférant une tolérance à certains herbicides. ceux
5 conférant une résistance à certains insectes, ceux conférant une tolérance à certaines maladies. etc. De tels gènes sont notamment décrits dans les demandes de brevet WO 91/02071 et WO 95/06128.

Parmi les gènes conférant une tolérance à certains herbicides, on peut citer le gène Bar conférant une tolérance au bialaphos, le gène codant pour une EPSPS appropriée
10 conférant une résistance aux herbicides ayant l'EPSPS comme cible comme le glyphosate et ses sels (US 4,535,060, US 4,769,061, US 5,094,945, US 4,940,835, US 5,188,642, US 4,971,908, US 5,145,783, US 5,310,667, US 5,312,910, US 5,627,061, US 5,633,435, FR 2 736 926), le gène codant pour la glyphosate oxydoréductase (US 5,463,175), ou encore un gène codant pour une HPPD conférant une tolérance aux herbicides ayant pour cible
15 l'HPPD comme les isoxazoles, notamment l'isoxafutole (FR 95 06800, FR 95 13570), les dicétonitriles (EP 496 630, EP 496 631) ou les tricétones, notamment la sulcotrione (EP 625 505, EP 625 508, US 5,506,195). De tels gènes codant pour une HPPD conférant une tolérance aux herbicides ayant pour cible l'HPPD sont décrits dans la demande de brevet WO 96/38567.

20 Parmi les protéines d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux insectes, on citera plus particulièrement les protéines Bt largement décrites dans la littérature et bien connues de l'homme du métier. On citera aussi les protéines extraites de bactéries comme *Photobacterium* (WO 97/17432 & WO 98/08932).

Parmi les protéines ou peptides d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de
25 résistance aux maladies on citera notamment les chitinases, les glucanases, l'oxalate oxydase, toutes ces protéines et leurs séquences codantes étant largement décrites dans la littérature, ou encore les peptides antibactériens et/ou antifongiques, en particulier les peptides de moins de 100 acides aminés riches en cystéines comme les thionines ou défensines de plantes, et plus particulièrement les peptides lytiques de toutes origines
30 comprenant un ou plusieurs ponts disulfures entre les cystéines et des régions comprenant des acides aminés basiques, notamment les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et PCT/FR98/01814, déposée le 18 août 1998) ou la drosomicine (PCT/FR98/01462, déposée le 8 juillet 1998).

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la protéine ou peptide
35 d'intérêt est choisi parmi les peptides éliciteurs fongiques, en particulier les élicitines (Kamoun & al., 1993 ; Panabières & al., 1995).

On peut également citer les gènes modifiant la constitution des plantes modifiées, en particulier la teneur et la qualité de certains acides gras essentiels (EP 666 918) ou encore la teneur et la qualité des protéines, en particuliers dans les feuilles et/ou les graines
40 desdites plantes. On citera en particulier les gènes codant pour des protéines enrichies en

acides aminés soufrés (Korit et al., Eur. J. Biochem. 195:329-334, 1991 ; WO 98/20133 ; WO 97/41239 ; WO 95/31554 ; WO 94/20828 ; WO 92/14822). Ces protéines enrichies en acides aminés soufrés auront également pour fonction de piéger et stocker la cystéine et/ou la méthionine excédentaire, permettant d'éviter les problèmes éventuels de toxicité

- 5 liés à une surproduction de ces acides aminés soufrés en les piégeant. On peut citer également des gènes codant pour des peptides riches en acides aminés soufrés et plus particulièrement en cystéines, les dits peptides ayant également une activité antibactérienne et/ou antifongique. On citera plus particulièrement les défensines de plantes, de même que les peptides lytiques de toute origine, et plus particulièrement les peptides lytiques
- 10 suivants: l'androctonine (WO 97/30082 et PCT/FR98/01814, déposée le 18 août 1998) ou la drosomicine (PCT/FR98/01462, déposée le 8 juillet 1998).

Les organismes hôtes de la présente invention peuvent également être utilisés pour la production de protéines d'intérêt dans les plantes ou "molecular farming". En effet l'invention concerne notamment des plantes transformées permettant d'obtenir des niveaux

15 d'expressions de gènes hétérologues plus élevés. Parmi les protéines d'intérêt, on citera notamment les peptides et les protéines de mammifères. La production d'immunoglobulines (US 5,990,385; US 5,639,947, 5,959,177) et d'interféron (US 4,956,282) ont par exemple été décrits dans les plantes.

- 20 Toutes les méthodes ou opérations décrites ci-dessous dans les exemples sont données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce choix n'a aucune incidence sur la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments
- 25 d'ADN sont décrites dans "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al ou dans Sambrook et al 1989.

Description des figures

FIGURE 1: Mutants *sgs3*

5

Exemples

Exemple 1

Isolement et identification du gène *SGS3* d'*Arabidopsis*

10 Le mutant SGS3 (affecté dans le gène SGS3) a été obtenu à partir du même protocole expérimental que celui ayant permis l'isolement des mutants *sgs1* et *sgs2* (Elmayan et al., Plant Cell 10:1747-1757, 1998). La lignée de départ était la lignée L1. L1 est une lignée transgénique obtenue par transformation de plantes de l'écotype Columbia par la construction 23b (Elmayan et Vaucheret, Plant J. 9:787-797, 1996). La lignée L1 ne
15 comporte qu'un seul locus transgénique. L'activité glucuronidase dans la lignée L1 est de 4000 nmol de 4-methylumbelliférone par minute et par microgramme de protéines totales dans les premiers jours du développement. Cette activité décroît ensuite très rapidement pour devenir inférieure à 5 nmol de 4-methylumbelliférone par minute et par microgramme de protéines totales 11 jours après la germination. L'inactivation de l'expression du
20 transgène 35S-*uidA* est post-transcriptionnelle, ainsi que l'ont démontré les expériences de "run-on" mettant en évidence une forte transcription du transgène 35S-*uidA* dans les plantes L1 montrant une très faible activité GUS (Elmayan et al., Plant Cell 10:1747-1757, 1998). Pour l'obtention de plantes mutantes de la lignée L1, 3000 graines de la lignée L1 ont été imbibées 16 heures dans une solution d'EMS (ethyl methanesulfonate) à 0,4%. Les
25 graines ont ensuite été semées et les plantes obtenues ont été cultivées en serre jusqu'à obtenir des graines d'autofécondation. Celles-ci ont été à nouveau semées en serre et dans les plantes obtenues, l'activité GUS a été mesurée 1 mois après la germination. Les plantes présentant une activité élevée à ce stade ont été à la fois croisées avec des plantes de l'écotype Columbia (pour vérifier que le locus transgénique reste sensible à l'inactivation post-transcriptionnelle), rétrocroisées avec la lignée L1 (pour évaluer l'état de récessivité vs
30 dominance des mutations obtenues) et croisées entre elles (pour classer les différents mutants obtenus en groupe de complémentation, chaque groupe définissant un gène). 6 mutants indépendants *sgs3* ont ainsi été isolés. Ces 6 mutations sont récessives. L'activité GUS dans ces 6 lignées mutantes, 1 mois après germination, est comprise entre 2500 et
35 3500 nmol de 4-methylumbelliférone par minute et par microgramme de protéines totales. L'activité GUS dans ces lignées mutantes, 1 mois après germination, est comprise entre 2500 et 3500 nmol de 4-methylumbelliférone par minute et par microgramme de protéines totales. Pour confirmer que les mutations *sgs3* affectent l'expression du transgène 35S-*GUS* au niveau transcriptionnel, l'activité GUS, l'accumulation de l'ARNm et le taux de
40 transcription ont été mesurés par des tests fluorimétriques, par l'analyse de blots d'ARNm

et par des expériences de "run-on". L'activité GUS est multipliée par un facteur de 300 dans les mutants *sgs2* par rapport à la lignée L1 alors que l'accumulation de l'ARNm est multipliée par un facteur de 250. Le taux de transcription n'est que multiplié par un facteur de 2.6 par rapport à la lignée L1. Pour vérifier que les mutations *sgs33* protégeaient de l'inactivation post-transcriptionnelle d'un autre gène que le gène *uidA*, un des mutants *sgs3* (nommé *sgs3-2*) a été croisée avec la lignée 2a3 (Elmayan et al., Plant Cell 10:1747-1757, 1998). La lignée 2a3 est une lignée transgénique d'*Arabidopsis thaliana* résultant de la transformation d'une plante de l'écotype Columbia par la construction 2a (Elmayan et al., Plant Cell 10:1747-1757, 1998) contenant la partie transcrite du gène *NIA2* d'*Arabidopsis* codant la nitrate reductase sous le contrôle du promoteur 35S et le gène de résistance à l'hygromycine *hpt*. Toutes les plantes de la lignée 2a3 homozygotes pour la construction 2a présentent une inactivation post-transcriptionnelle des gènes *Nia2* (transgéniques et endogènes) conduisant à la chlorose de la plante puis à sa mort. Lorsque le locus transgénique 2a3 est à l'état hétérozygote, seule une partie des plantes subissent l'inactivation post-transcriptionnelle. Le stade à laquelle se met en place cette inactivation est variable d'une plante à l'autre. Chez certaines plantes l'inactivation est suffisamment tardive pour permettre la production de pollen et de graines. Les plantes hybrides issues du croisement entre le mutant *sgs3-2* et la lignée 2a3 ont été cultivées en serre et les graines d'autofécondation ont été récoltées. Celles-ci ont été semées en serre et les plantes obtenues ne présentant pas de chlorose ont été conservées pour récolter leur graines d'autofécondation. Nous avons alors semé les différents lots de graines sur un milieu gélosé contenant 20mg/l d'hygromycine. Parmi ceux-ci, certains ne donnaient que des plantes résistantes à l'hygromycine et ne montrant aucun signe de chlorose tout au long de leur développement. Parmi ces lignées résistantes à l'inactivation post-transcriptionnelle des gènes de nitrate reductase, certaines étaient également homozygotes pour la construction 23b. Nous avons également montré que les plantes de toutes ces lignées présentaient une activité GUS élevée tout au long de leur développement. Ces résultats montrent donc que la mutation *sgs3*, non seulement protège de l'inactivation post-transcriptionnelle du transgène 35S-*uidA* mais également des transgènes et gènes endogènes *NIA2*. Certaines de ces lignées résistantes à l'inactivation post-transcriptionnelle des gènes de nitrate reductase et homozygote pour le locus 2a3 ne possédaient plus la construction 23b. Ces plantes ont été nommées SGS3-2 2a3.

Afin de déterminer le rôle biologique du gène correspondant aux mutations *sgs3*, des mutant *sgs3-1* ont été inoculées avec le virus de la mosaïque du concombre (CMV) souche I17F. Sur les plantes sauvages, l'infection par cette souche virale conduit à des plantes dont le développement est plus lent et altéré: feuilles de la rosette plus petites, hampe florale longue mais très souple, fertilité réduite mais non nulle. Chez les mutants *sgs3-1*, l'infection par cette souche virale conduit à une altération accrue du développement: les plantes ont un port particulièrement buissonnant, les feuilles de la rosette sont petites et vrillées, la hampe florale atteint en fin de développement une taille de l'ordre de 5 cm, les

plantes sont complètement stériles. Ces expériences montrent donc que le gène correspondant aux mutations *sgs3* permet de limiter les effets négatifs sur le développement causés par l'infection du virus CMV.

Deux mutants *sgs3-1* et *sgs3-2* ont été croisées avec des plantes de l'écotype Landsberg. Sur ces plantes hybrides (F1) résultant de ces croisements, les graines d'autofécondation ont été récoltées. Ces graines ont été semées in vitro sur un milieu gélosé contenant 50 mg/l de kanamycine afin de sélectionner les plantes (F2) possédant le transgène 23b. Ces plantes résistantes à la kanamycine ont été repiquées et cultivées en serre. L'activité GUS dans ces plantes a été mesurée à différents stades de leur développement. Seules les plantes présentant une activité GUS élevée tout au long du développement (et donc homozygote pour la mutation *sgs3*) ont été conservées et les graines d'autofécondation ont été récoltées. 120 lignées F2 homozygotes pour la mutation *sgs3-1* (lignées F2-1) et 90 lignées F2 homozygotes pour la mutation *sgs3-2* (lignées F2-2) ont été ainsi obtenues. Les graines d'autofécondation de chacune de ces lignées ont été semées en serre et pour chaque lignée un pool de plantes a été récolté afin d'en extraire l'ADN. Ces ADN ont été utilisés pour localiser les mutations *sgs3* sur le génome d'*Arabidopsis*. La localisation initiale a été réalisée grâce aux lignées F2-1. Les lignées F2-2 nous ont ensuite permis de vérifier que la mutation *sgs3-2* était localisée dans la même région du génome que la mutation *sgs3-1*. Ces analyses ont montré que les mutations *sgs3* étaient situées entre les marqueurs moléculaires 13H2L et 3B3D. Le polymorphisme correspondant au marqueur moléculaire 13H2L a été révélé par l'hybridation (de type Southern blot) de l'ADN total de plantes d'*Arabidopsis*, digéré par l'enzyme de restriction HindIII, par un fragment d'ADN radioactif correspondant à l'extrémité gauche du chromosome artificiel de levure (YAC) 13H2 (sonde 13H2L). Le polymorphisme correspondant au marqueur moléculaire 3B3D a été révélé par l'hybridation (de type Southern blot) de l'ADN total de plantes d'*Arabidopsis*, digéré par l'enzyme de restriction HindIII, par un fragment d'ADN radioactif correspondant à l'extrémité droite du YAC 3B3 (sonde 3B3).

Par hybridation moléculaire de type Southern sur une membrane sur laquelle a été transférée l'ADN d'une banque de chromosome artificiel de bactéries (BAC IGF) par les fragments d'ADN radioactif correspondant aux sondes 13H2L et 3B3D, nous avons pu déterminer que ces 2 fragments d'ADN hybridaient sur un même BAC : le BAC F20I20. Ces résultats montrent donc que les mutations *sgs3-1* et *sgs3-2* affectaient une séquence d'ADN comprise dans le BAC F20I20.

De l'ADN du BAC F20I20 a ensuite été purifié. Il a été partiellement digéré par l'enzyme de restriction Sau3AI. Les fragments d'ADN résultant ont été clonés au site BamHI de l'ADN de transfert du plasmide binaire (permettant la transformation de plantes via *Agrobacterium*) pBin+. Les plasmides résultant ont été introduits dans *E. coli* puis dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58pMP90. Les souches bactériennes résultantes ont été utilisées pour transformer des plantes des lignées *sgs3-2* 2a3. La souche

bactérienne 356 a permis d'obtenir 20 lignées transgéniques. Parmi ces 20 lignées, 19 ont montré des signes de chlorose identiques à ceux observés sur la lignée 2a3. Sur 3 de ces plantes nous avons pu montrer par hybridation de type northern en utilisant comme sonde le gène *NLA2* d'*Arabidopsis thaliana*, que cette chlorose résultait de la non accumulation des transcrits des gènes de nitrate réductase (transgéniques et endogènes) et donc était due à l'inactivation post-transcriptionnelle des gènes de nitrate réductase. Parmi ces 19 plantes, 2 ont donné des graines d'autofécondation. Les plantes issues de ces graines, cultivées en serre, ont également montré des signes de chlorose.

La séquence d'ADN inséré au site BamHI du plasmide pBin+ et ayant conduit à l'isolement de la souche bactérienne 356 a été déterminée. Des sous-clones du clone 356 ont été réalisés dans le vecteur pBin+ et la même lignée *sgs3-2 2a3* a été transformée par ces sous-clones afin de déterminer ceux capables de restaurer la fonction du gène *SGS3*. Le plus petit sous-clone capable de restaurer cette fonction constitue le gène *SGS3* tel qu'il est décrit dans ce brevet. Par analyse informatique l'ORF de *SGS3* a pu être prédite. La séquence du cDNA contenant l'ORF du gène *SGS3* et donc la position des séquences promotrices, terminatrices et introniques de *SGS3* ont été vérifiées après avoir isolé et cloné cette séquence. Pour l'isoler nous avons d'abord réalisé une réaction de reverse-transcription à partir d'ARN total d'*Arabidopsis thaliana*. Puis nous avons réalisé une réaction de PCR sur ce pool de cDNA à l'aide du couple de primers p356AD' AAAATGAGTTCTAGGGCTGGTCC) et P356Y' (GTCTCAATCATCTTCATTGTGAAGGCC). Ces primers sont situés aux 2 extrémités de l'ORF de *SGS3*. Ce produit de PCR a été cloné et séquencé.

En utilisant le logiciel BLAST aucune homologie significative n'a pu être trouvée entre la séquence *SGS3* (en nucléotides ou en acides aminés) et une quelconque séquence présente dans les bases de données.

Exemple 2

Analyse des mutants *sgs3*

La séquence du gène *SGS3* a été déterminée dans 5 mutants *sgs3*. Une réaction de PCR a été effectuée sur l'ADN génomique de ces 5 mutants en utilisant les primers p356AD' et P356Y' (voir exemple 1). Cette réaction permet l'amplification de tout le gène *SGS3*. Le fragment amplifié grâce à cette réaction de PCR a été séquencé.

Cinq mutations ponctuelles distinctes ont ainsi été identifiées chez les différents mutants *sgs3*. Ces mutations correspondent à quatre codons stop et un changement d'acide aminé. Les différentes mutations observées chez les mutants *sgs3* sont représentées dans la figure 1. L'acide aminé marqué en gras indique la position de la mutation dans le polypeptide *SGS3*. * indique la présence d'un codon stop et () indique un nouvel acide aminé substitué à l'acide aminé marqué en gras touché par la mutation.

Exemple 3

Construction de cassettes d'expression pour la surexpression et l'inhibition de SGS3

On réalise d'abord une réaction de type PCR sur de l'ADN complémentaire d'*Arabidopsis thaliana* en utilisant comme amorces les oligonucléotidiques suivants :

- 5 p356AD' : AAAATGAGTTCTAGGGCTGGTCC
P356Y' : GTCTCAATCATCTTCATTGTGAAGGCC

La séquence nucléotidique ainsi obtenue est ensuite traitée avec l'enzyme « klenow » pour générer aux extrémités de la séquence amplifiée des extrémités « franches ». Puis la séquence est clonée entre le promoteur 35S et le terminateur du virus
10 de la mosaïque du chou-fleur au site SmaI du vecteur pRT100.

Pour la surexpression de SGS3 on sélectionne les clones tels que la séquence correspondant à p356AD' se situe près du promoteur 35S. Pour l'inhibition de SGS3 on sélectionne les clones tels que la séquence correspondant à p356Y' se situe près du promoteur 35S. Cette construction Assgs3 permet l'expression d'un ARNm anti-sens de
15 l'ARNm de SGS3.

Exemple 4

Transformation des plantes

Les cassettes d'expression construites tel qu'il est décrit ci-dessus sont ensuite
20 introduites dans un vecteur binaire pour permettre leur introduction via *Agrobacterium tumefaciens* dans les plantes. Le vecteur binaire utilisé est le plasmide pBIN+ (Van Engelen et al., Transgenic Research 4, 288-290, 1995). Ceci est réalisé en digérant les constructions obtenues ci-dessus par l'enzyme SphI (qui libère les cassettes d'expression) et en liguant le produit de cette digestion au plasmide pBIN+ digéré par l'enzyme SphI.
25

Exemple 5

Inhibition de l'expression du gène SGS3 par des antisens

L'ADNc complet du gène SGS3 a été cloné en orientation antisens (aSGS3) entre le promoteur 35S (p35S) et le terminateur 35S (t35S). Le gène chimérique p35S-aSGS3-t35S
30 a été re-cloné dans le vecteur binaire pBiB-Hyg puis transféré dans *Agrobacterium tumefaciens*. Des plantes de la lignée L1 (gène p35S-GUS-tRbcS soumis à la PTGS) ont été transformées par trempage dans les agrobacteries. Les plantes transformées ont été sélectionnées sur milieu additionné d'hygromycine. L'activité GUS du transgène p35S-GUS-tRbcS a été mesurée dans les plantes L1 non transformées, dans 28 transformants
35 hygromycine-résistants, ainsi que dans les mutants sgs3 obtenus par mutagenèse EMS de la lignée L1. L'activité GUS dans les plantes L1 non transformées est comprise entre 0 et 10 nmol MU / mn / ug de protéines tandis que l'activité GUS dans les mutants sgs3 est comprise entre 3000 et 5500 nmol MU / mn / ug de protéines. 11 des 28 transformants hygromycine-résistants ont montré une activité GUS comprise entre 3000 et 5500 nmol

MU / mn / ug de protéines, montrant que le gène SGS3 peut être inhibé par le gène chimérique p35S-aSGS3-t35S, mimant ainsi une mutation sgs3.

Revendications

- 1) Polynucléotide caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide choisi parmi les
5 polynucléotides suivants:
 - a) le polynucléotide de la SEQ ID No. 1, et
 - b) le polynucléotide de la SEQ ID No. 2.
- 2) Polynucléotide caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide choisi parmi les
10 polynucléotides suivants:
 - a) un polynucléotide capable de s'hybrider de manière sélective à un polynucléotide selon la revendication 1, et
 - b) un polynucléotide homologue à au moins 80 % à un polynucléotide selon la
15 revendication 1.
- 3) Polynucléotide selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il restaure un mutant *sgs3*
d'Arabidopsis thaliana.
- 4) Polynucléotide caractérisé en ce qu'il comprend le polynucléotide dont la séquence est
20 comprise entre la position 1 et la position 695 de la SEQ ID No. 1.
- 5) Polynucléotide caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide choisi parmi les
polynucléotides suivants:
 - a) un polynucléotide capable de s'hybrider de manière sélective à un polynucléotide selon
25 la revendication 4, et
 - b) un polynucléotide homologue à au moins 80 % à un polynucléotide selon la
revendication 4.
- 6) Polynucléotide selon la revendication 5 caractérisé en ce qu'il a une activité promotrice
30 dans les cellules végétales et les plantes.
- 7) Polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend le polypeptide de la SEQ ID No. 3.
- 8) Polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi les
35 polypeptides suivants:
 - a) un fragment biologiquement actif du polypeptide de la SEQ ID No. 3; et
 - b) un polypeptide homologue à au moins 80 % au polypeptide de la SEQ ID No. 3.
- 9) Polypeptide selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il restaure un mutant *sgs3*
40 *d'Arabidopsis thaliana*.

10) Polynucléotide caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 7-9.

11) Cassette d'expression caractérisée en ce qu'elle comprend dans le sens de la transcription:

- a) un promoteur fonctionnel dans un organisme hôte; et
- b) un polynucléotide selon l'une des revendications 1-3 et 10; et
- c) une séquence terminatrice dans ledit organisme hôte.

12) Cassette d'expression caractérisée en ce qu'elle comprend dans le sens de la transcription:

- d) un promoteur fonctionnel dans un organisme hôte; et
- e) un polynucléotide, selon l'une des revendications 1-3 et 10, en orientation antisens ; et
- f) une séquence terminatrice dans ledit organisme hôte.

13) Cassette d'expression caractérisée en ce qu'elle comprend dans le sens de la transcription :

- a) un polynucléotide selon l'une des revendications 4-6;
- b) un polynucléotide codant pour un polypeptide hétérologue;
- c) une séquence terminatrice dans les cellules végétales ou les plantes.

14) Vecteur d'expression ou de transformation comprenant un polynucléotide selon l'une des revendications 1-6 et 10 ou une cassette d'expression selon l'une des revendications 11-13.

15) Procédé de transformation des organismes hôtes, en particulier des cellules végétales ou des plantes, par intégration dans ledit organisme hôte d'au moins un polynucléotide selon l'une des revendications 1-6 et 10 et/ou d'au moins une cassette d'expression selon l'une des revendications 11-13 et/ou d'au moins un vecteur selon la revendication 14.

16) Procédé pour exprimer un gène hétérologue dans une plante caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- a) on transforme ladite plante avec ledit gène hétérologue; et
- b) on inhibe l'expression d'un polynucléotide selon l'une des revendications 1-3 et 10 dans ladite plante.

17) Procédé selon la revendication 16 caractérisé en ce que l'étape b) comprend la transformation de ladite plante avec une cassette d'expression selon la revendication 12.

- 18) Procédé pour exprimer un gène hétérologue dans une plante caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:
- b) on transforme ladite plante avec ledit gène hétérologue;
 - c) on inactive l'expression d' un polynucléotide selon l'une des revendications 1-3 et 10
5 dans ladite plante.
- 19) Organisme hôte transformé comprenant au moins un polynucléotide selon l'une des revendications 1-6 et 10 et/ou d'au moins une cassette d'expression selon l'une des revendications 11-13 et/ou d'au moins un vecteur selon la revendication 14.
10
- 20) Organisme hôte selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un gène hétérologue codant pour un peptide ou une protéine d'intérêt.
- 21) Organisme hôte selon l'une des revendications 19 ou 20, caractérisé en ce que
15 l'organisme hôte est choisi parmi les bactéries, les levures, les champignons, les cellules végétales ou les plantes.
- 22) Organisme hôte selon la revendication 21, caractérisé en ce que les plantes sont choisies parmi le maïs, le blé, l'orge, le sorgho, le colza, le soja, le riz, la betterave, le
20 tabac, le coton.

1/1

MSSRAGPMSKEKNVQGGYRPEVEQLVQGLAGTRLASSQDDGGEW*EVISKK
NKNKPGNTSGKTWVSQNSNPPRAWGGQQQGRGSNVSGRGNNVSGRGNGN
GRGIQANISGRGRALSRYDNNFVAPPPVSRPPLEGGWNW*QARGGSAQHT
AVQ*EFPDVEDDDVDNASEEENDSDALDDSDDDLASDDYDSQKSHGSRK
QNKWFKKFFGSLDSLIEQINEPQRQWHCPACQNGPGAIDWYNLHPLLHAR
TKGARRVKLHRELAEVLEKDLQMRGASVIPCGEIYGQWKGLGEDEKDYEIV
WPPMVIIMNTRLDKDDNDKWLGMGNQELLEDFDKYEALRARHSYGPQ*GH
RGMSVLMFESSATGYLEAERLHRELAEMGLDRIAWGQKRSMFSGGVRQLY
GFLATKQDLDFNQHSQGKTRLKFELKSYQEMVVKELRQISEDNQQLNYFKN
KLSKQNKHAKVLEESLEIMSEKLRRTAEDNRIVRQRTKMQHEQNREE(K)MD
AHDRFFMDSIKQIHERRDAKEENFEMLQQQERAKVVGGQQQQNTNPSSNDDC
RKRAEEVSSFIEFQEKEMEEFVEEREMLIKDQEKKMEDMKKRHHHEEIFDLEK
EFDEALEQLMYKHGLHNEDD

FIG.1

LISTE DE SEQUENCES

<110> AVENTIS CROPS SCIENCE SA & INRA

<120> Nouveau gène SGS3 de plante et son utilisation

<130> PH99040G1

<140>

<141>

<150> FR 9909417

<151> 1999-07-16

<150> FR 0001006

<151> 2000-01-26

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3275

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> primer_bind

<222> (693)..(715)

<223> p356AD'

<220>

<221> primer_bind

<222> Complement((2926)..(2952))

<223> p356Y'

<400> 1

gacaaaacaaa	caaaaatttaa	gcaagtcacg	ttcgtagcaa	taaattaata	gtgggaacaa	60
taaagttaaag	cgaaaaagga	aaaaaaaaag	tacaaaaatg	aaaacaaaat	caaactgaat	120
gaaaatttg	agtcacagaat	cggaacacg	aggccgtttt	agagcttaat	aagcttcctc	180
atttgtctct	tcttcgtcag	tttattttct	tcctccggag	tcctgactca	ctactctcac	240
tctccggcgc	tttaaaccta	cgttctccgt	cgtttactct	gtaagttttc	tgccctagag	300
cctccgatcg	cctcacgcga	tgcatctcgt	gctcgatttc	tctttttctt	cgctggaaaa	360
attgccctaa	tggtctcgat	ttcgaagggt	tttgtgctat	gggttacttt	tttccctata	420
ttttatagtt	cttaggtaac	gatacctgcg	tcttactggt	tttgttcatt	ttgttggtgt	480
ttcacccgtt	agtcgctgat	cggagtat	gactgtgaaa	aatccttcgt	tttttggttt	540
ttgtttcata	taaatcggat	tgatctacct	tttgtgcttt	gatgtttggt	ttttgagcct	600
atgcgttggt	ggcttggtat	aacttcacgt	tcagtgtgtg	attttgagat	tttggtagtgt	660
actgtgggtt	tctttgggtg	ctatagggtg	taaaaatgag	ttctaggggt	ggtccaatgt	720
ctaaggaaaa	gaacgttcag	ggtggttata	ggcctgaggt	tgaacagttg	gttcaagggt	780
tggcagggac	gagactggct	tcttcacaag	atgatggagg	agagtgggag	gtcatttcca	840
agaagaacaa	gaacaaacca	ggaaacactt	ctggaaaaac	ttgggtttct	cagaattcga	900
atcctcctag	agcttggggg	ggtcagcagc	aaggagagag	tagcaacgta	tctgggagag	960
gaaacaatgt	atccgggaga	ggtaacggca	atgggtcggg	cattcaagct	aacatatctg	1020
gtcggggacg	agcgttgagc	agaaagtatg	ataacaactt	tgtggcaccc	ccacctgtat	1080
ctcgccctcc	tttgaagga	ggatggaatt	ggcaggcaag	aggaggttct	gctcagcaca	1140
cagctgtgca	ggagtttctt	gacgtggagg	atgatgtgga	taatgcttct	gaggaagaga	1200
atgattccga	tgccttggtg	gattctgatg	acgaccttgc	aagtgatgat	tatgactcgg	1260
atgtgagtca	aaagagccat	ggatcacgaa	agcagaataa	gtgggttcaaa	aagttctttg	1320
gcagcttgga	tagcttgctg	atcgagcaga	taaatgaacc	acagaggcag	tggcattgtc	1380
cagcttgctc	gaacggacct	ggtgccatcg	attggtataa	cctgcaccct	ctactagctc	1440
atgcgaggac	aaaaggagct	aggcgagtta	agctccatag	agaattggct	gaagttttag	1500
aaaaggatct	acagatgaga	ggcgcatctg	tcattccttg	tggtgagatt	tatgggcagt	1560

```

ggaaggggtt gggtgaggat gaaaaggatt atgaaattgt ctggcctcca atggtcacatca 1620
tcatgaatac tagactggat aaggacgata acgataaggt ggaattcttc tgtcttttac 1680
ttctttaatt ttctcttgc attctactga tcttagaatg ttacattgta gtggctcggc 1740
atgggcaacc aagagctgct ggaatacttc gacaagtatg aggctcttag agcacgccat 1800
tctatggtc cacagggcca tctggggatg agtgttctga tgtttgagag cagtgccact 1860
ggctatttgg aggcggaacg cctccaccgg gagtttagctg agatgggggtt agatagaatt 1920
gcttgggggtc agaagcgag tatgttttct ggaggtgttc gccaaactga tggcttccct 1980
gcaacgaagc aagatctgga catattcaat caacactctc aaggttctct ccccaaaaga 2040
aatttgatat atgcttttag tttgtcatt ggaatttaaa gttttgttgg tccgtgttaa 2100
tgcactgtgt atgtatatat ctatgattca ttaggcaaaa caaggctgaa attcgagttg 2160
aaatcatacc aagagatggg tgtaaaggag ctgaggcaga tctctgagga caatcagcag 2220
ctgaactact ttaagaacaa gctctcaaaa cagaacaagc acgccaaggt gcttgaggaa 2280
tctctggaaa ttatgagcga gaagctgcgt agaactgcag aggataatcg gatcgtgaga 2340
cagagaacta agatgcagca tgaacagaac agggaagagg tatgattttt cctagaaaat 2400
cacaacttg acattttgta ttacctactg attcacattt ttgattatat tgtccaacaa 2460
aaaacctgtg gtggtttgaa gatggatgca cagcaggtt ttttcatgga ttcaatcaaa 2520
cagatccatg aaagaagaga cgcaaaggag gagaatttcg agatgttgca gcagcaggaa 2580
cgtgccaagg ttgttgacca gcagcagcag aacattaatc cctctagcaa tgacgattgc 2640
cgaaagaggt atatgtacta actaacataa tccctctggc gttttgttt ttcaaaccta 2700
agagtaactg aattattccg gttttgatc tttcgcagag ctgaggaagt gtcaagcttc 2760
atcgagtttc aagagaaaga gatggaggag tttgtggaag agagggagat gctgataaaa 2820
gatcaagaga agaagatgga agacatgaag aagaggcatc acgaggagat atttgatctg 2880
gagaaagaat ttgatgaggc tttggaacag ctcatgtaca agcatggcct tcacaatgaa 2940
gatgattgag acaaaagtct ggtacacaag acaagactaa gtttctttgt tttgctttg 3000
gtatgtcgga aagtaggaga tctgagagac tccatttaaa tactaggaca aatctaagga 3060
gattatagat tattatcctc caatttttag tagacggatc taaggaagca ttaagttctt 3120
gtgactaaaa ccaagtttcc ttagtatattt gttttttttt ggtaaaattt catatgaaag 3180
ttagacatat taccaaacgt cagagtgaat cacagaatgg caaatcaaaa tcatgttttt 3240
agaattttat atctacaaaa tatatgggta caaat 3275

```

<210> 2

<211> 1878

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1878)

<400> 2

```

atg agt tct agg gct ggt cca atg tct aag gaa aag aac gtt cag ggt 48
Met Ser Ser Arg Ala Gly Pro Met Ser Lys Glu Lys Asn Val Gln Gly
1 5 10 15

ggt tat agg cct gag gtt gaa cag ttg gtt caa ggt ttg gca ggg acg 96
Gly Tyr Arg Pro Glu Val Glu Gln Leu Val Gln Gly Leu Ala Gly Thr
20 25 30

aga ctg gct tct tca caa gat gat gga gga gag tgg gag gtc att tcc 144
Arg Leu Ala Ser Ser Gln Asp Asp Gly Gly Glu Trp Glu Val Ile Ser
35 40 45

aag aag aac aag aac aaa cca gga aac act tct gga aaa act tgg gtt 192
Lys Lys Asn Lys Asn Lys Pro Gly Asn Thr Ser Gly Lys Thr Trp Val
50 55 60

tct cag aat tcg aat cct cct aga gct tgg ggt ggt cag cag caa ggg 240
Ser Gln Asn Ser Asn Pro Pro Arg Ala Trp Gly Gly Gln Gln Gln Gly
65 70 75 80

aga ggt agc aac gta tct ggg aga gga aac aat gta tcc ggg aga ggt 288
Arg Gly Ser Asn Val Ser Gly Arg Gly Asn Asn Val Ser Gly Arg Gly

```

85	90	95	
aac ggc aat ggt cgg ggc att caa gct aac ata tct ggt cgg gga cga Asn Gly Asn Gly Arg Gly Ile Gln Ala Asn Ile Ser Gly Arg Gly Arg 100 105 110			336
gcg ttg agc aga aag tat gat aac aac ttt gtg gca ccc cca cct gta Ala Leu Ser Arg Lys Tyr Asp Asn Asn Phe Val Ala Pro Pro Pro Val 115 120 125			384
tct cgc cct cct ttg gaa gga gga tgg aat tgg cag gca aga gga ggt Ser Arg Pro Pro Leu Glu Gly Gly Trp Asn Trp Gln Ala Arg Gly Gly 130 135 140			432
tct gct cag cac aca gct gtg cag gag ttt cct gac gtg gag gat gat Ser Ala Gln His Thr Ala Val Gln Glu Phe Pro Asp Val Glu Asp Asp 145 150 155 160			480
gtg gat aat gct tct gag gaa gag aat gat tcc gat gct ttg gat gat Val Asp Asn Ala Ser Glu Glu Glu Asn Asp Ser Asp Ala Leu Asp Asp 165 170 175			528
tct gat gac gac ctt gca agt gat gat tat gac tcg gat gtg agt caa Ser Asp Asp Asp Leu Ala Ser Asp Asp Tyr Asp Ser Asp Val Ser Gln 180 185 190			576
aag agc cat gga tca cga aag cag aat aag tgg ttc aaa aag ttc ttt Lys Ser His Gly Ser Arg Lys Gln Asn Lys Trp Phe Lys Lys Phe Phe 195 200 205			624
ggc agc ttg gat agc ttg tcg atc gag cag ata aat gaa cca cag agg Gly Ser Leu Asp Ser Leu Ser Ile Glu Gln Ile Asn Glu Pro Gln Arg 210 215 220			672
cag tgg cat tgt cca gct tgt cag aac gga cct ggt gcc atc gat tgg Gln Trp His Cys Pro Ala Cys Gln Asn Gly Pro Gly Ala Ile Asp Trp 225 230 235 240			720
tat aac ctg cac cct cta cta gct cat gcg agg aca aaa gga gct agg Tyr Asn Leu His Pro Leu Leu Ala His Ala Arg Thr Lys Gly Ala Arg 245 250 255			768
cga gtt aag ctc cat aga gaa ttg gct gaa gtt tta gaa aag gat cta Arg Val Lys Leu His Arg Glu Leu Ala Glu Val Leu Glu Lys Asp Leu 260 265 270			816
cag atg aga ggc gca tct gtc att cct tgt ggt gag att tat ggg cag Gln Met Arg Gly Ala Ser Val Ile Pro Cys Gly Glu Ile Tyr Gly Gln 275 280 285			864
tgg aag ggt ttg ggt gag gat gaa aag gat tat gaa att gtc tgg cct Trp Lys Gly Leu Gly Glu Asp Glu Lys Asp Tyr Glu Ile Val Trp Pro 290 295 300			912
cca atg gtc atc atc atg aat act aga ctg gat aag gac gat aac gat Pro Met Val Ile Ile Met Asn Thr Arg Leu Asp Lys Asp Asp Asn Asp 305 310 315 320			960
aag tgg ctc ggc atg ggc aac caa gag ctg ctg gaa tac ttc gac aag Lys Trp Leu Gly Met Gly Asn Gln Glu Leu Leu Glu Tyr Phe Asp Lys 325 330 335			1008
tat gag gct ctt aga gca cgc cat tcc tat ggt cca cag ggc cat cgt			1056

Tyr	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Arg	His	Ser	Tyr	Gly	Pro	Gln	Gly	His	Arg		
			340					345					350				
ggg	atg	agt	gtt	ctg	atg	ttt	gag	agc	agt	gcc	act	ggc	tat	ttg	gag	1104	
Gly	Met	Ser	Val	Leu	Met	Phe	Glu	Ser	Ser	Ala	Thr	Gly	Tyr	Leu	Glu		
		355					360					365					
gcc	gaa	cgc	ctc	cac	cgg	gag	tta	gct	gag	atg	ggg	tta	gat	aga	att	1152	
Ala	Glu	Arg	Leu	His	Arg	Glu	Leu	Ala	Glu	Met	Gly	Leu	Asp	Arg	Ile		
	370					375					380						
gcc	tgg	ggt	cag	aag	cgc	agt	atg	ttt	tct	gga	ggt	gtt	cgc	caa	ctg	1200	
Ala	Trp	Gly	Gln	Lys	Arg	Ser	Met	Phe	Ser	Gly	Gly	Val	Arg	Gln	Leu		
385				390						395					400		
tat	ggc	ttc	ctt	gca	acg	aag	caa	gat	ctg	gac	ata	ttc	aat	caa	cac	1248	
Tyr	Gly	Phe	Leu	Ala	Thr	Lys	Gln	Asp	Leu	Asp	Ile	Phe	Asn	Gln	His		
			405					410						415			
tct	caa	ggc	aaa	aca	agg	ctg	aaa	ttc	gag	ttg	aaa	tca	tac	caa	gag	1296	
Ser	Gln	Gly	Lys	Thr	Arg	Leu	Lys	Phe	Glu	Leu	Lys	Ser	Tyr	Gln	Glu		
		420					425					430					
atg	gtt	gta	aag	gag	ctg	agg	cag	atc	tct	gag	gac	aat	cag	cag	ctg	1344	
Met	Val	Val	Lys	Glu	Leu	Arg	Gln	Ile	Ser	Glu	Asp	Asn	Gln	Gln	Leu		
	435					440					445						
aac	tac	ttt	aag	aac	aag	ctc	tca	aaa	cag	aac	aag	cac	gcc	aag	gtg	1392	
Asn	Tyr	Phe	Lys	Asn	Lys	Leu	Ser	Lys	Gln	Asn	Lys	His	Ala	Lys	Val		
	450					455					460						
ctt	gag	gaa	tct	ctg	gaa	att	atg	agc	gag	aag	ctg	cgt	aga	act	gca	1440	
Leu	Glu	Glu	Ser	Leu	Glu	Ile	Met	Ser	Glu	Lys	Leu	Arg	Arg	Thr	Ala		
465				470					475					480			
gag	gat	aat	cgg	atc	gtg	aga	cag	aga	act	aag	atg	cag	cat	gaa	cag	1488	
Glu	Asp	Asn	Arg	Ile	Val	Arg	Gln	Arg	Thr	Lys	Met	Gln	His	Glu	Gln		
			485					490						495			
aac	agg	gaa	gag	atg	gat	gca	cac	gac	agg	ttt	ttc	atg	gat	tca	atc	1536	
Asn	Arg	Glu	Glu	Met	Asp	Ala	His	Asp	Arg	Phe	Phe	Met	Asp	Ser	Ile		
		500						505					510				
aaa	cag	atc	cat	gaa	aga	aga	gac	gca	aag	gag	gag	aat	ttc	gag	atg	1584	
Lys	Gln	Ile	His	Glu	Arg	Arg	Asp	Ala	Lys	Glu	Glu	Asn	Phe	Glu	Met		
	515					520						525					
ttg	cag	cag	cag	gaa	cgt	gcc	aag	gtt	gtt	ggc	cag	cag	cag	cag	aac	1632	
Leu	Gln	Gln	Gln	Glu	Arg	Ala	Lys	Val	Val	Gly	Gln	Gln	Gln	Gln	Asn		
	530					535					540						
att	aat	ccc	tct	agc	aat	gac	gat	tgc	cga	aag	aga	gct	gag	gaa	gtg	1680	
Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Asn	Asp	Asp	Cys	Arg	Lys	Arg	Ala	Glu	Glu	Val		
545				550				555						560			
tca	agc	ttc	atc	gag	ttt	caa	gag	aaa	gag	atg	gag	gag	ttt	gtg	gaa	1728	
Ser	Ser	Phe	Ile	Glu	Phe	Gln	Glu	Lys	Glu	Met	Glu	Glu	Phe	Val	Glu		
			565					570						575			
gag	agg	gag	atg	ctg	ata	aaa	gat	caa	gag	aag	aag	atg	gaa	gac	atg	1776	
Glu	Arg	Glu	Met	Leu	Ile	Lys	Asp	Gln	Glu	Lys	Lys	Met	Glu	Asp	Met		
		580						585					590				

aag aag agg cat cac gag gag ata ttt gat ctg gag aaa gaa ttt gat 1824
Lys Lys Arg His His Glu Glu Ile Phe Asp Leu Glu Lys Glu Phe Asp
595 600 605

gag gct ttg gaa cag ctc atg tac aag cat ggc ctt cac aat gaa gat 1872
Glu Ala Leu Glu Gln Leu Met Tyr Lys His Gly Leu His Asn Glu Asp
610 615 620

gat tga	1878
Asp	
625	

<210> 3

<211> 625

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

Met 1	Ser	Ser	Arg	Ala 5	Gly	Pro	Met	Ser	Lys 10	Glu	Lys	Asn	Val	Gln 15	Gly
Gly	Tyr	Arg	Pro	Glu	Val	Glu	Gln	Leu	Val	Gln	Gly	Leu	Ala	Gly	Thr
			20					25					30		
Arg	Leu	Ala	Ser	Ser	Gln	Asp	Asp	Gly	Gly	Glu	Trp	Glu	Val	Ile	Ser
		35					40					45			
Lys	Lys	Asn	Lys	Asn	Lys	Pro	Gly	Asn	Thr	Ser	Gly	Lys	Thr	Trp	Val
	50					55					60				
Ser	Gln	Asn	Ser	Asn	Pro	Pro	Arg	Ala	Trp	Gly	Gly	Gln	Gln	Gln	Gly
65				70						75					80
Arg	Gly	Ser	Asn	Val	Ser	Gly	Arg	Gly	Asn	Asn	Val	Ser	Gly	Arg	Gly
			85						90					95	
Asn	Gly	Asn	Gly	Arg	Gly	Ile	Gln	Ala	Asn	Ile	Ser	Gly	Arg	Gly	Arg
			100					105					110		
Ala	Leu	Ser	Arg	Lys	Tyr	Asp	Asn	Asn	Phe	Val	Ala	Pro	Pro	Pro	Val
		115					120					125			
Ser	Arg	Pro	Pro	Leu	Glu	Gly	Gly	Trp	Asn	Trp	Gln	Ala	Arg	Gly	Gly
	130					135					140				
Ser	Ala	Gln	His	Thr	Ala	Val	Gln	Glu	Phe	Pro	Asp	Val	Glu	Asp	Asp
145				150						155				160	
Val	Asp	Asn	Ala	Ser	Glu	Glu	Glu	Asn	Asp	Ser	Asp	Ala	Leu	Asp	Asp
			165						170					175	
Ser	Asp	Asp	Asp	Leu	Ala	Ser	Asp	Asp	Tyr	Asp	Ser	Asp	Val	Ser	Gln
			180					185					190		
Lys	Ser	His	Gly	Ser	Arg	Lys	Gln	Asn	Lys	Trp	Phe	Lys	Lys	Phe	Phe
	195						200					205			
Gly	Ser	Leu	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile	Glu	Gln	Ile	Asn	Glu	Pro	Gln	Arg
	210					215					220				
Gln	Trp	His	Cys	Pro	Ala	Cys	Gln	Asn	Gly	Pro	Gly	Ala	Ile	Asp	Trp
225				230						235					240
Tyr	Asn	Leu	His	Pro	Leu	Leu	Ala	His	Ala	Arg	Thr	Lys	Gly	Ala	Arg
			245						250					255	
Arg	Val	Lys	Leu	His	Arg	Glu	Leu	Ala	Glu	Val	Leu	Glu	Lys	Asp	Leu
			260					265					270		
Gln	Met	Arg	Gly	Ala	Ser	Val	Ile	Pro	Cys	Gly	Glu	Ile	Tyr	Gly	Gln
	275							280				285			
Trp	Lys	Gly	Leu	Gly	Glu	Asp	Glu	Lys	Asp	Tyr	Glu	Ile	Val	Trp	Pro
	290					295					300				
Pro	Met	Val	Ile	Ile	Met	Asn	Thr	Arg	Leu	Asp	Lys	Asp	Asp	Asn	Asp
305				310						315					320
Lys	Trp	Leu	Gly	Met	Gly	Asn	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu	Tyr	Phe	Asp	Lys
			325						330				335		
Tyr	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Arg	His	Ser	Tyr	Gly	Pro	Gln	Gly	His	Arg
			340					345					350		

Gly Met Ser Val Leu Met Phe Glu Ser Ser Ala Thr Gly Tyr Leu Glu
 355 360 365
 Ala Glu Arg Leu His Arg Glu Leu Ala Glu Met Gly Leu Asp Arg Ile
 370 375 380
 Ala Trp Gly Gln Lys Arg Ser Met Phe Ser Gly Gly Val Arg Gln Leu
 385 390 395 400
 Tyr Gly Phe Leu Ala Thr Lys Gln Asp Leu Asp Ile Phe Asn Gln His
 405 410 415
 Ser Gln Gly Lys Thr Arg Leu Lys Phe Glu Leu Lys Ser Tyr Gln Glu
 420 425 430
 Met Val Val Lys Glu Leu Arg Gln Ile Ser Glu Asp Asn Gln Gln Leu
 435 440 445
 Asn Tyr Phe Lys Asn Lys Leu Ser Lys Gln Asn Lys His Ala Lys Val
 450 455 460
 Leu Glu Glu Ser Leu Glu Ile Met Ser Glu Lys Leu Arg Arg Thr Ala
 465 470 475 480
 Glu Asp Asn Arg Ile Val Arg Gln Arg Thr Lys Met Gln His Glu Gln
 485 490 495
 Asn Arg Glu Glu Met Asp Ala His Asp Arg Phe Phe Met Asp Ser Ile
 500 505 510
 Lys Gln Ile His Glu Arg Arg Asp Ala Lys Glu Glu Asn Phe Glu Met
 515 520 525
 Leu Gln Gln Gln Glu Arg Ala Lys Val Val Gly Gln Gln Gln Asn
 530 535 540
 Ile Asn Pro Ser Ser Asn Asp Asp Cys Arg Lys Arg Ala Glu Glu Val
 545 550 555 560
 Ser Ser Phe Ile Glu Phe Gln Glu Lys Glu Met Glu Glu Phe Val Glu
 565 570 575
 Glu Arg Glu Met Leu Ile Lys Asp Gln Glu Lys Lys Met Glu Asp Met
 580 585 590
 Lys Lys Arg His His Glu Glu Ile Phe Asp Leu Glu Lys Glu Phe Asp
 595 600 605
 Glu Ala Leu Glu Gln Leu Met Tyr Lys His Gly Leu His Asn Glu Asp
 610 615 620
 Asp
 625